

Fungale Kolonisation bei Patienten mit Mukoviszidose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Berenbrinker, Sina

2016

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. D. Hartl

2. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. K. Hamprecht

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Cystische Fibrose.....	1
1.2 Pilze	3
1.2.1 <i>Candida albicans</i>	4
1.2.2 <i>Aspergillus fumigatus</i>	5
1.3 Zielsetzung der Arbeit	6
2. Material und Methoden	7
2.1 Studienaufbau	7
2.1.1 MUKO.DOK	7
2.2 Klinische Parameter	7
2.2.1 Mikrobiologie.....	8
2.2.2 Lungenfunktion	9
2.2.3 BMI	10
2.2.4 Allergologie	10
2.2.5 Medikamentöse Therapie.....	11
2.3 Datenanalyse	12
3. Ergebnisse	13
3.1 Patientenkohorte	13
3.2 Fungale Kolonisation.....	14
3.3 Erstmanifestation von <i>Candida</i> und <i>Aspergillus</i>	17
3.4 Lungenfunktion.....	19
3.5 BMI	25
3.6 Allergologie	29
3.7 ABPA	30
3.8 Medikamentöse Therapie.....	31
4. Diskussion	33
4.1 Fungale Kolonisation.....	33
4.2 Erstmanifestation	36
4.3 Lungenfunktion.....	37
4.4 BMI	39
4.5 Allergologie	40
4.6 ABPA	41
4.7 Medikamentöse Therapie	42
4.8 Schlussfolgerung.....	44
5. Zusammenfassung	46
6. Literaturverzeichnis	48
7. Erklärung zum Eigenanteil	53
8. Veröffentlichung	54
Danksagung	55
Anhang	56

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
<i>A. f.</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. n-f.</i>	<i>Aspergillus non-fumigatus</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
BMI	Body mass Index
bzw.	beziehungsweise
<i>C. a.</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. n-a.</i>	<i>Candida non-albicans</i>
CF	Cystische Fibrose
CFRD	Cystic Fibrosis-related Diabetes
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
d. h.	das heißt
FEV1	forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen
FEV1%	FEV1 in Prozent der Norm
<i>H. i.</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HbA1c	Glycohämoglobin
IgE	Immunglobulin E
kU	Kilo Unit
k. A.	keine Angabe
MEF ₂₅	Maximal expiratorischer Fluss bzw. Atemstromstärke, bei der sich noch 25% der Vitalkapazität in den Lungen befindet
MEF ₂₅ %	MEF ₂₅ in Prozent der Norm
MW	Mittelwert
n. s.	nicht signifikant
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
<i>P. a.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RAST	Radio-Allergo-Sorbens-Test
s.	siehe
SA	Standardabweichung
SAP	Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung
<i>S. a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. m.</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Tab.	Tabelle
Vgl.	Vergleich

1. Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Cystische Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, ist eine autosomal-rezessiv vererbare Stoffwechselkrankheit, die besonders häufig bei Kaukasiern auftritt. Mit einer Frequenz von 1:25 heterozygot asymptomatischen Merkmalsträgern und 1:2500 homozygot betroffenen Neugeborenen zählt sie zu den häufigsten lebensverkürzenden Erbkrankheiten. Allein in Deutschland gibt es über 8000 Betroffene. (1, 2)

Der Gendefekt beruht auf einer Mutation des CFTR „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“-Gens auf Chromosom 7, welcher erstmals 1989 beschrieben wurde. (3) Das CFTR-Gen codiert für ein Protein, welches sich überwiegend in der Apikalmembran von sekretorischen Epithelzellen eines cAMP-abhängigen Chloridkanals befindet. (4) Da wegen des Defekts kein oder kaum Chlorid aus der Zelle transportiert werden kann, ist die Natrium-Resorption durch die Natrium-Kanäle (ENaC) kompensatorisch erhöht. Folglich tritt mehr Wasser und Chlorid in die Zelle und führt zur Produktion eines hochviskösen Sekrets.

Klinisch manifestiert sich die Krankheit, die alle exokrinen Drüsen in unterschiedlichem Ausmaße befällt, teilweise schon sehr früh durch verzögerten Mekoniumsabgang und/oder Gedeihstörungen. Außerdem zeigen die Patienten Elektrolytverluste durch stark salzhaltigen Schweiß und können eine Pankreasinsuffizienz, Leberfibrose und weitere Folgeerkrankungen entwickeln. (5) Männliche Patienten leiden an Infertilität durch Obliteration des Ductus deferens.

Die häufigste Todesursache unter den Betroffenen ist mit über 95 % die respiratorische Insuffizienz. (6) Beispielsweise werden nahezu ein Drittel aller Doppel-Lungentransplantationen international bei CF-Patienten durchgeführt. Die Problematik im Bereich des Respirationstrakts beginnt mit chronisch produktivem Husten und einer Bronchialobstruktion. Durch den hyperviskösen Mukus kommt es häufig zur bakteriellen Besiedlung und Infektion mit *Haemophilus influenzae* (*H. i.*), *Staphylococcus aureus* (*S. a.*) und später mit

Pseudomonas aeruginosa (*P. a.*). Darüber hinaus sind weitere Problemkeime wie *Burkholderia cepacia* beschrieben. Neutrophile Granulozyten, die der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen dienen, reagieren mit massiver Freisetzung von Neutrophilen-Elastase. Dies führt zu einem Ungleichgewicht auf Seiten der Proteasen, was in einer chronischen Inflammation und schließlich im Verlust des Lungengerüsts und Alveolargewebes resultiert. (7)

Während die respiratorische Insuffizienz im Jahre 1960 das mittlere Überleben auf ca. zehn Jahre limitierte, hat ein im Jahr 2011 geborenes Kind mit CF eine mittlere Überlebenschance von 50 Jahren. Dies spiegelt die großen Fortschritte der Forschung und Therapien in den letzten Jahren wieder. (8)

Liegen klinische Symptome, wie z.B. ein Mekoniumileus oder ein familiäres Risiko vor, wird zur Identifizierung der Krankheit ein Schweißtest durchgeführt. Dieser stellt die derzeitige Standarddiagnostik zur Erkennung einer CF dar und misst die bei dieser Krankheit erhöhten Natrium- und Chloridkonzentrationen im Schweiß. Ein Neugeborenencreening, welches für manche Teile Deutschlands beschrieben worden ist, wurde landesweit noch nicht etabliert. (9)

Da die Patienten im Verlauf multiple Komorbiditäten bezüglich der CF entwickeln können, ist ein früher Beginn von Routineuntersuchungen entscheidend. Empfohlen werden diese mindestens viermal pro Jahr und umfassen die Messung der Körpergröße und des Gewichts mit Perzentilenbestimmung, eine Spirometrie mit Pulsoxymetrie, außerdem eine Blutbilduntersuchung und ein mikrobiologischer Test der Respirationstrakflora. Zur Jahresuntersuchung gehören zusätzlich die Labordiagnostik bezüglich Leber-, Pankreas- und Nierenfunktion sowie die Überprüfung der fettlöslichen Vitamine und des Eisenstoffwechsels. Ab einem Alter von zehn Jahren werden ein oraler Glukosetoleranztest (OGTT) und eine Langzeitzuckermessung (HbA1c) zur Erkennung eines Cystic Fibrosis-Related Diabetes (CFRD) empfohlen. Darüber hinaus wird die Elastase-1-Konzentration im Stuhl ermittelt sowie ein Röntgenthorax, eine Sonographie des Abdomens und ein Echokardiogramm angeordnet. Über weitere Untersuchungen wie Allergietests,

Blutspiegelkontrollen von bestimmten Antibiotika, CT-Untersuchungen oder Bronchoskopien wird individuell entschieden. (10)

Mukoviszidose ist eine Krankheit, die sich sowohl genotypisch als auch phänotypisch facettenreich präsentiert und stete Erkenntnisgewinne im Bereich der Diagnostik und Therapie mit sich bringt. Während CF klassischerweise mit den oben genannten Keimbesiedlungen assoziiert ist, wurde in den letzten Jahren eine steigende Prävalenz fungaler Besiedlungen nachgewiesen. (11)

1.2 Pilze

Da Pilze und ihre Kolonisation des Respirationstrakts zunehmenden Anteil an der CF-Forschung eingenommen haben, soll im Folgenden genauer auf diese eingegangen werden. Pilze sind Eukaryonten, d. h. sie besitzen eine Zellkernmembran, welche ihr komplexes Genom umschließt. Ihre Zellwand besteht aus fadenförmigen Chitin und Glukan als Grundgerüst mit eingewobenen Mannanen und Proteinen. (12)

Eingeteilt werden die medizinisch relevanten Pilze in Fadenpilze (Dermatophyten), Hefe- und Schimmelpilze. Die beim Menschen am häufigsten isolierten Pilze sind in über 60 % der Fälle *Candida albicans* (*C. a.*), *Aspergillus fumigatus* (*A. f.*) und *Trichophyton rubrum*. (13) Neben dem natürlichen Vorkommen auf der Erde, wo sie ein Viertel der Biomasse ausmachen und essentiell für das Pflanzenwachstum sind, spielen sie in der Medizin eine große Rolle in der Medikamenten- und Impfstoffherstellung.

Klinisch betrachtet sind sie potentielle Auslöser von Allergien und führen durch ihre Schimmelpilzantigene noch häufiger als Gräserpollen zu Immunreaktionen und Befindlichkeitsstörungen. Häufig werden sie jedoch aufgrund starker Kreuzreaktionen nicht als Verursacher der Allergie ermittelt.

Darüber hinaus können bestimmte Schimmelpilze Mykotoxine, die im Sekundärstoffwechsel entstanden sind, freigeben. Diese werden aerogen oder über verdorbene Lebensmittel vom Menschen aufgenommen, können akute oder chronische Vergiftungserscheinungen hervorrufen und sogar immunsuppressive, teratogene oder kanzerogene Wirkungen zeigen. (12)

Unter den insgesamt über eine Million verschiedenen Arten existieren ca. 150 Opportunisten. Diese können beim Menschen je nach Stoffwechsellage und Immunkompetenz Mykosen auslösen und in manchen Fällen auch tödlich sein.

(12) Zu den allgemeinen Ursachen für steigende Häufigkeiten von Pilzinfektionen gehören der weitverbreitete Gebrauch von Immunsuppressiva, der Einsatz von Breitspektrum Antibiotika und die invasiveren operativen Eingriffe, wie Transplantationen. (14)

Von den oben genannten häufigsten Pilzen zeigen *C. a.* und *A. f.* die höchsten Prävalenzwerte im Respirationstrakt bei CF-Patienten. (15, 16)

1.2.1 *Candida albicans*

C. a. wurde in den letzten Jahren durch sein häufiges Auftreten in Mikrobiologiebefunden bei CF-Patienten vermehrt Aufmerksamkeit zugewandt.

(17) Die Gattung *Candida* gehört mit über 200 Arten zu den Sprosspilzen bzw. Hefen. Seine Einzigartigkeit zeigt er dadurch, dass er die Fähigkeit besitzt, verschiedene morphologische Formen anzunehmen. So kann er, abhängig von Nährstoffbedingungen und Temperaturen, durch Veränderungen der Mutterzelle seine Gestalt anpassen. Beispielsweise bildet er Pseudohyphen oder echte Pilzfäden (Hyphen) aus und vermehrt sich durch Ausstülpung in Form einer Knospe (Sprossung). (18, 19) Die Hefen kommen als apathogene opportunistische Kommensale bei ca. 50 % der gesunden Erwachsenen vor, zeigen aber bei immunsupprimierten Patienten ein pathogenes Potential. (20)

C. a., als wichtigstes Mitglied der Hefen, ist an einer Reihe von Infektionen wie vulvovaginaler, oraler, oesophagealer oder intertriginöser Candidose beteiligt und kann nicht selten in Zusammenhang mit hohem Alter, Neutropenie und Corticosteroidtherapie eine invasive systemische Candidose mit hohen Mortalitätsraten auslösen. (20, 21) Weitere *Candida* Spezies sind ursächlich für nosokomiale Pneumonien und stellen Erreger für Infektionen des Urogenitaltrakts dar. (22) *C.* Spezies verfügen über hydrolytische Enzyme, wie Proteasen, Phospholipasen und Hämolytine, die es ihnen ermöglichen sich festzusetzen, Zellen zu schädigen und in das Wirtsgewebe einzudringen. (14) Die Pilzkolonisation erfolgt durch die Mikroflora der Patientenhaut,

medizinisches Personal oder Infusionsflüssigkeiten. Häufige Eintrittspforten stellen Katheter, Beatmungsschläuche, Implantate oder weiteres medizinisches Material dar, auf welchen die Pilze in Biofilmen nachgewiesen werden können. (23) Diese Biofilme stellen sichere Nischen für Mikroorganismen dar. Sie liefern Schutz vor therapeutischen Interventionen und können für die Entstehung von persistierenden Infektionen ursächlich sein. (24, 25)

Bei Patienten mit Mukoviszidose wurden hohe Prävalenzwerte von *C. a.* in Sputum oder tiefen Rachenabstrichen beschrieben. Beispielsweise wurden bei 60,7 % der CF-Patienten in einer irischen Studie (26) bzw. bei 87,9 % der Patienten in einer spanischen Studie (27) mindestens ein positiver *Candida* Nachweis bestätigt. Insgesamt ist jedoch noch wenig über die Pathogenität der Pilze in den Luftwegen von Patienten mit Mukoviszidose bekannt. Chotirmall entdeckte, dass eine chronische *C. a.* Kolonisation ein Vorzeichen für einen Lungenfunktionsabfall und eine im Krankenhaus behandlungsbedürftige Verschlimmerung der Krankheit ist. Er beschrieb damit als Erster ein pathogenes Potential für *C. a.* in den Atemwegen von CF-Patienten. (26)

1.2.2 *Aspergillus fumigatus*

Der Schimmelpilz *A. f.* ist der bisher bekannteste und am häufigsten untersuchte Pilz bei Patienten mit Mukoviszidose. Er kommt ubiquitär, z.B. in Hausstaub, feuchten Wänden und zersetzten organischen Materialien vor. Seine Sporen besitzen einen Durchmesser von 2-3,5 µm, wodurch er bis in die terminalen Atemwege und Alveolen vordringen kann. (28) Physiologisch können die Sporen bei gesunden Menschen durch gerichtete Zilienbewegungen und Makrophagen des angeborenen Immunsystems schnell und ohne Entzündungsreaktionen eliminiert werden. Diese mukoziliäre Clearance ist bei CF-Patienten jedoch aufgrund von Mukusplaques gestört. (29)

Bei Patienten mit Mukoviszidose sind bisher verschiedenste Manifestationen von *A. f.* in den Luftwegen bekannt. Neben selteneren Krankheitsbildern, wie dem Aspergillom, der invasiven pulmonalen Aspergillose und der *A. f.*-Bronchitis, werden häufig allergische Reaktionen auf *A. f.* beschrieben. (30) Diese können sich in Form einer Sensibilisierung auf *A. f.* Antigene oder einer

Allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) manifestieren. (11) Letztere, die erstmals 1952 aufgezeigt wurde, geht mit einem beschleunigten Lungenfunktionsabfall durch Bronchiektasien und schwerer Fibrosierung einher und betrifft vorwiegend adoleszente und erwachsene CF-Patienten mit einer Prävalenz von 2-15 %. (31-33)

Klinische Diagnosekriterien einer ABPA, welche von Nelson bereits 1979 definiert wurden, sind teilweise heute noch Standard in CF-Zentren. (34) Zu diesen Kriterien gehören pfeifende Atemgeräusche, neu aufgetretene pulmonale Infiltrate und erhöhte Gesamt Immunglobulin E (IgE) Serumlevel, spezifische IgE/G Antikörper gegen *A. f.* und der Nachweis von *A. f.* im Sputum. (35) Neuere auf Nelson basierende Kriterien umfassen einen positiven dermalen Schnelltest auf *A. f.*, Niederschläge von Antikörpern gegen *A. f.* im Serum und erhöhte IgE Serum Level über 1000 Units/ml. Zusätzlich stellt der alleinige Verdacht eines Arztes, begründet durch reversible Bronchokonstriktionen oder Asthma, ein Diagnosekriterium dar sowie eine periphere Eosinophilie über 1000/ml. (36)

Die Spannweite von *A. f.* Nachweisen in Rachenabstrichen eingeschlossener Patienten mit Mukoviszidose reichte von 10,4 % laut einer in der Türkei durchgeführten Studie bis 60,6 % laut einer spanischen Studie. (37, 38) Damit ist *A. f.* nach *C. a.* der am zweithäufigsten nachgewiesene Pilz bei CF-Patienten. (15)

Über die Pathogenität einer chronischen *A. f.* Kolonisation der Lunge, ohne die Diagnosekriterien einer ABPA zu erfüllen, gibt es verschiedene Ansichten. (31, 39) Die Wechselbeziehung zwischen einer *A. f.* Besiedlung des Respirationstraktes und der Lungenfunktion soll im Folgenden analysiert und diskutiert werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Überblick über die Tübinger CF-Patienten im Bezug zum Kolonisationsstatus von *C. a.* und *A. f.* zu liefern. Außerdem sollen die Korrelationen zwischen dem Nachweis dieser Pilzspezies und deren Einfluss auf klinische Parameter analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Wir schlossen Patienten, die an Mukoviszidose erkrankt sind und während der Studiendauer von Januar 2003 bis einschließlich Dezember 2012 in der Tübinger CF-Ambulanz behandelt wurden, in unsere Studie ein. Insgesamt waren über 200 Patienten in der CF-Ambulanz verzeichnet. Viele von ihnen sind jedoch im Verlauf an die Erwachsenen Ambulanz nach Stuttgart weitergeleitet worden oder waren bereits verstorben. Aus diesem Grund verblieben für unsere Analysen 128 Patienten, die sich zu Beginn der Studie noch in Tübingen in Behandlung befanden. Die Patientendaten wurden aus dem standardisierten und zertifizierten CF-Dokumentationsprogramm MUKO.DOK entnommen. Alle fehlenden Werte wurden von uns aus den Programmen Lauris und SAP sowie aus Krankenakten verschiedener Fachabteilungen recherchiert, gesammelt und in Excel-Tabellen zusammengetragen.

2.1.1 MUKO.DOK

Das Softwaremodul MUKO.DOK ist ein Programm, welches der Datenerfassung und -auswertung von Patienten mit Mukoviszidose dient und als Weiterentwicklung des Vorgängers CFAS von der Firma axaris 2008 programmiert wurde. 80 Einrichtungen in Deutschland nutzen die Software derzeit in ihren CF-Ambulanzen, um eine detaillierte Qualitätssicherung zu gewährleisten. (2) Die für unsere Studie nötigen Daten konnten uns mit Hilfe der Informatikerin in Form von Excel-Tabellen zugänglich gemacht werden.

2.2 Klinische Parameter

Für unsere Studie schlossen wir neben den Stammdaten wie Alter, Geschlecht, Genotyp und Behandlungszeitraum wichtige, den Krankheitsverlauf eventuell bestimmende Werte mit ein. Diese sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

2.2.1 Mikrobiologie

Um einen Kolonisationsstatus der CF-Patienten zu erheben, wurden abhängig von Alter und Mitarbeit der Patienten entweder Sputumproben oder tiefe Pharyngealabstriche entnommen. Diese wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Tübingen bearbeitet. Der dabei entstandene Befundbericht umfasste die Untersuchung auf allgemeine aerobe und anaerobe Bakterien mit Resistenzbestimmungen sowie die Untersuchung auf Pilze. Die zu untersuchenden Pilzspezies wurden auf Nährböden gezüchtet und anhand ihres Aussehens, ihrer Farbe sowie aufgrund einer Hyphen- oder Sporenbildung eingeteilt. Bei unklarer Zuordnung erfolgte der Nachweis mittels Gensequenzierung. Diese fungale Nachweismethodik nahm mehr Zeit in Anspruch und wurde nur bei positivem Ergebnis nachgemeldet. Für unsere Auswertung konzentrierten wir uns auf folgende Keime, die in Tabelle 1 (Tab. 1) aufgelistet sind.

Tab. 1: Auflistung der einbezogenen Keime

Spezies umfassen alle nicht- (*non-*) *albicans*, bzw. nicht- (*non-*) *fumigatus* Arten

Pilze	Bakterien
<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sonstige <i>Candida</i> Spezies	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
Sonstige <i>Aspergillus</i> Spezies	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Um die Unterschiede der Kolonisation einzelner Pilze zu verdeutlichen und somit vergleichbar zu machen, teilten wir die Pilzhäufigkeiten in vier Gruppen ein. Hierfür benutzten wir nachfolgende Kriterien, die erstmals von Lee et al in ähnlicher Weise für die Einteilung von chronischen *P. a.* Infektionen bei CF verwendet wurden. (40) (Tab. 2)

Tab. 2: Definition des fungalen Kolonisationsstatus

Einteilung des Kolonisationsstatus der Patienten in vier Gruppen in Abhängigkeit von der Häufigkeit der positiven Befunde von allen mikrobiologischen Befunden im gesamten Untersuchungszeitraum.

Kolonisation	Positive Befunde	Gruppe
chronisch	> 50%	3
intermittierend	35-50%	2
selten	< 35%	1
nie	0%	0

2.2.2 Lungenfunktion

Die Lungenfunktion wurde mittels Spirometrie im Bodyplethysmographen MasterScope®Body oder dem FlowScreen, beide von der Firma Jaeger hergestellt, ermittelt. Dieses medizinische Verfahren dient der Messung des Atem- und Lungenvolumens und der Luftflussgeschwindigkeiten, anhand derer die Lungenfunktion abgeschätzt werden kann. Die forcierte Einsekundenkapazität oder das forcierte expiratorische Volumen (FEV1) ist der am häufigsten bei CF-Patienten gemessene Lungenfunktionsparameter. Als jährlicher FEV1-Reduktionsparameter stellt er eines der sensitivsten Prognosekriterien für diese Patienten dar. (41)

Mit Hilfe des Programms LabManagerV5.3.0, Cardinal Health wurden die gemessenen Daten mit denen von Gesunden anhand Perzentilenkurven in Prozent der Norm (FEV1%) verglichen und eingeordnet. Zu erwähnen ist, dass diese Werte bei MUKO.DOK erst ab einem Alter von sechs Jahren dokumentiert wurden.

Des Weiteren schlossen wir die MEF₂₅ mit ein, welche als die maximale expiratorische Atemstromstärke bei 25 % der im Thorax befindlichen Vitalkapazität definiert ist. Das heißt, dass bereits 75 % der Vitalkapazität ausgeatmet sind. Von diesen und von den Werten in Prozent der Norm (MEF₂₅%) berechneten wir jeweils die Mittelwerte (MW) pro Patient.

Bei jeder Lungenfunktionsuntersuchung wurden in den meisten Fällen drei Messungen durchgeführt und das jeweils beste Ergebnis in MUKO.DOK übertragen. Da die Lungenfunktionswerte der Patienten großen Schwankungen

unterlagen, gliederten wir die Einschränkung der Lungenfunktion ähnlich wie Schluchter et al. (42) So unterschieden wir in Abhängigkeit von Alter und FEV1% MW vier Gruppen: mild, moderate-mild, moderate, severe, Vergleich (Vgl.) Klassifikation im Anhang. (Tab. 12)

2.2.3 BMI

Der Body Mass Index (BMI) wurde bei jeder Untersuchung aus dem Gewicht in kg und der Körpergröße in m mit folgender Formel: $BMI = kg/m^2$ bestimmt und einer altersentsprechenden Perzentile zugeordnet. (43) Pro Patient errechneten wir einen Gesamtmittelwert (BMI MW) sowie einen Gesamtmittelwert in Prozent (BMI% MW), der sich aus den einzelnen Perzentilenwerten bestimmen ließ.

2.2.4 Allergologie

Bei den allergologischen Daten, welche in der universitären Hautklinik in Tübingen gemessen und dokumentiert wurden, konzentrierten wir uns auf die Gesamt IgE Werte im Serum der Patienten. Diese teilten wir zur besseren Übersicht in die folgenden drei Gruppen ein. (Tab. 3)

Tab. 3: Einteilung von Gesamt IgE

Gruppe	Gesamt IgE, in kU/l
0	< 500
1	500-1000
2	≥ 1000

Zusätzlich wurde mit dem Radio-Allergo-Sorbens-Test (RAST) ein auf *A. f.* antigenspezifischer IgE Antikörpernachweis im Serum durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen nachgewiesener *A. f.* Kolonisation und einer bestehenden Allergie spezifisch gegen diesen Pilz nachweisen zu können. Die gemessenen Werte teilte das entsprechende Labor in sieben verschiedene RAST-Klassen ein. (Tab. 4)

Tab. 4: Einteilung von spezifischem *Aspergillus fumigatus* IgE

Klasse	A. f. IgE, in kUA/l
0	0-0,19
1	0,2-0,69
2	0,7-3,49
3	3,5-17,49
4	17,5-52,49
5	52,5-99,99
6	>100

Wir bezogen uns jeweils auf die MW aller Messungen pro Patient, um einen Querschnitt aller Gesamt- und spezifischen IgE Werte zu erhalten.

2.2.5 Medikamentöse Therapie

Da bei Mukoviszidose eine Multiorganbeteiligung charakteristisch ist, müssen die Patienten interdisziplinär betreut und therapiert werden. Bei der Auswertung der medikamentösen Therapie schlossen wir alle fungiziden oder fungistatischen Behandlungen in unsere Analysen mit ein. Bezüglich der Antibiotikatherapie konzentrierten wir uns auf die inhalative Darreichungsform, da diese verglichen mit intravenös applizierten Antibiosen das Lungenparenchym und Bronchialsekret besser penetrieren kann. Eingeschlossen wurde ebenfalls das systemisch eingesetzte Azithromycin, welches ein Makrolid mit anti-inflammatorischem Effekt darstellt und sich positiv auf die Lungenfunktion von CF-Patienten mit *Pseudomonas* Nachweis ausgewirkt hat. (44)

Azithromycin und Corticosteroide wurden beide nur in der Langzeittherapie betrachtet, welche als Zeitraum von sechs Monaten definiert wurde.

Mukolytische Arzneimittel und Bronchodilatoren, wie β_2 -Sympatomimetika oder Anticholinergika, wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen.

2.3 Datenanalyse

Für die statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung benutzen wir Excel und BMI SPSS Statistics, Version 22. Die Anwendung von statistischen Verfahren und Tests erfolgte nach den Grundsätzen für biometrische Auswertungen. Die Auswertung der Daten erfolgte in Kooperation mit Prof. Martus, Institut für Biometrie, Universität Tübingen.

Für die deskriptive Statistik wurde der Mittelwert (MW), ein Minimum und Maximum und die Standardabweichung (SA) verwandt. Korrelationen von großen Fallzahlen mit nominal verteilten Werten wurden mit 2-seitigem *Chi-Quadrat nach Pearson* getestet. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $< 0,05$ gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkohorte

Unsere Studie umfasste 128 Patienten, die bis Ende 2012 zur regelmäßigen Behandlung in der Tübinger CF-Ambulanz erschienen. 65 Patienten (50,8 %) waren männlich und 63 (49,2 %) weiblich, Vgl. Tab. 5. Das Durchschnittsalter aller Patienten betrug 14,5 Jahre mit einer SA von 9,2 Jahren. Zum damaligen Zeitpunkt hatte der jüngste Patient das erste Lebensjahr nicht vollendet, während der älteste Patient 54 Jahre alt war. Der Durchschnittsbehandlungszeitraum der einzelnen Patienten in Tübingen umfasste 8,7 Jahre (\pm 4,2 Jahre). Genanalysen ergaben, dass 32,8 % homozygot und 54,7 % heterozygot für Δ F508 waren, welche die häufigste Mutation des CFTR-Gens auf Chromosom 7 ist. 12,5 % der Patienten zeigten andere weniger verbreitete Mutationen.

Wichtige den Krankheitsverlauf unserer Patienten beeinflussende Diagnosen waren die bei 106 Patienten (82,8 %) bestätigte Pankreasinsuffizienz sowie der bei 16 Patienten (12,5 %) nachgewiesene Cystic Fibrosis Related Diabetes (CFRD). Die Diagnose Allergische bronchopulmonare Aspergillose (ABPA), welche mit dem Pilz *A. f.* in engem Zusammenhang steht, wurde bei fünf Patienten (3,9 %) diagnostiziert.

Tab. 5: Allgemeine Charakteristika der CF-Patienten, n=128

Charakteristika	Anzahl (n)	in %
Geschlecht		
° männlich	65	50,8
° weiblich	63	49,2
Mutation		
° homozygot Δ F508	42	32,8
° heterozygot Δ F508	70	54,7
° andere	16	12,5
Diagnosen		
° Pankreasinsuffizienz	106	82,8
° CFRD	16	12,5
° ABPA	5	3,9

CFRD: Cystic Fibrosis Related Diabetes; ABPA: Allergische bronchopulmonale Aspergillose

Korrelationsanalysen ergaben, dass ausgehend von Geschlecht und Genotyp keine Zusammenhänge zu Lungenfunktions-, Gewichtsveränderungen oder Pilznachweisen gefunden wurden.

3.2 Fungale Kolonisation

Über einen Zeitraum von zehn Jahren wurden von den einbezogenen 128 Patienten insgesamt 4450 Mikrobiologiebefunde gesammelt. Pro Patient konnten im Mittel 34,8 Befunde ($\pm 17,4$) erhoben werden.

Der Hefepilz *C. a.* trat bei 111 Patienten mindestens einmal im Pharyngealabstrich bzw. in einer Sputumprobe auf und war mit 86,7 % der am häufigsten nachgewiesene Pilz unserer Patienten. Im gesamten Verlauf wurden bei 71 Teilnehmern (55,5 %) weitere 20 verschiedene *Candida* Spezies mindestens einmal nachgewiesen. *C. dubliniensis* wurde, gefolgt von *C. parapsilosis*, am zweithäufigsten dokumentiert.

Den Schimmelpilz *A. f.* bestätigten wir bei 59 Patienten mindestens einmal im Sputum oder Pharyngealsekret. Die Häufigkeit entspricht 53,9 % aller einbezogenen Patienten. Am zweithäufigsten zeigte sich *A. flavus*, gefolgt von *A. terreus*, die wir zur Gruppe der *Aspergillus* Spezies zählten. Diese *A. n-f.* Pilze konnten nur bei 19 Patienten nachgewiesen werden (14,9 %).

Abbildung (Abb.) 1 liefert eine Übersicht über den Kolonisationsstatus aller Patienten, eingeteilt in vier Gruppen bezüglich der Häufigkeit positiver Befunde, (Vgl. Tab. 2). Mit *C. a.* waren 13,3 % der Patienten nie, 34,4 % selten, 20,3 % intermittierend und 32,0 % chronisch kolonisiert. Dem gegenüber waren 44,5 % der Patienten nie, 47,7 % selten, 4,7 % intermittierend und 3,1 % chronisch mit anderen *Candida* Spezies kolonisiert. 69 der 71 auf *C. n-a.* positiv getesteten Patienten waren ebenfalls mit *C. a.* besiedelt.

Der Kolonisationsstatus der Patienten bezüglich *A. f.* zeigte, dass 46,1 % nie positiv und 39,0 % kaum kolonisiert waren, während 5,5 % intermittierend und 9,4 % chronisch besiedelt waren. Mit weiteren *Aspergillus* Spezies waren 85,2 % der Patienten nie, 14,1 % selten und 0,8 % intermittierend kolonisiert. Niemand war chronisch von diesen Schimmelpilzen betroffen. Bis auf eine

Person waren die Patienten mit *Aspergillus* Spezies nur dann kolonisiert, wenn auch ein positiver Nachweis mit *A. f.* vorlag.

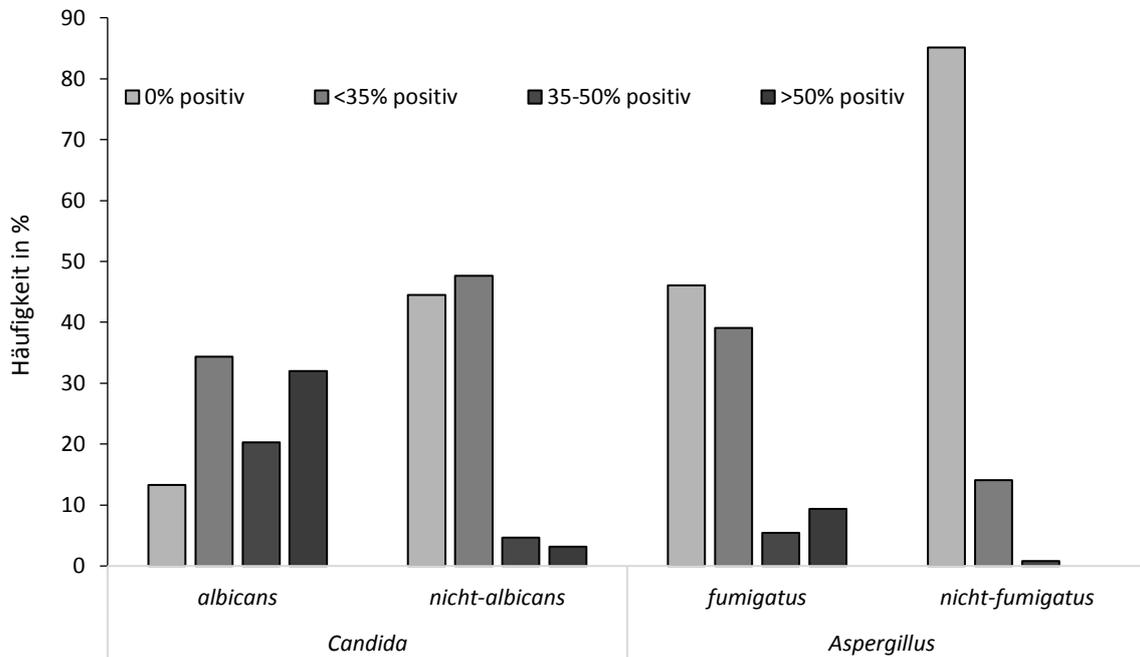


Abb. 1: Darstellung des Kolonisationsstatus aller Patienten mit *Candida* und *Aspergillus* in Abhängigkeit von der Häufigkeit der positiven Befunde in %, Einteilung der Kolonisationsgruppen nach nie (0%), selten (<35%), intermittierend (35-50%) oder chronisch (>50%) positiven fungalen Nachweisen; n=128

Zur Komplementierung der Ergebnisdarstellung mikrobiologischer Befunde, werden im Folgenden die Häufigkeiten bakterieller Kolonisationen genannt. Als häufigster Keim wurde *S. a.* mindestens einmal bei 93 % der Patienten nachgewiesen. Darauf folgten mit 76 % *H. i.* und mit 68 % *P. a.* Das Vorkommen von *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. m.*) wurde bei 45 % der Patienten bestätigt.

Die Korrelationsanalysen der Pilzbesiedlung ergaben, dass eine *C. a.* Kolonisation positiv mit einer Co-Kolonisation mit weiteren *Candida* Spezies ($p=0,07$), *A. f.* ($p=0,046$) sowie den anderen *Aspergillus* Spezies ($p=0,033$) assoziiert war. Dem gegenüber ergab die Analyse einen negativen Zusammenhang zwischen *C. a.* Besiedlung und *H. i.* ($p=0,018$). Das heißt, je häufiger *C. a.* vorhanden war, desto seltener wurde *H. i.* nachgewiesen.

Bezüglich einer Co-Kolonisation korrelierte *C. a.* tendenziell ($p=0,61$) mit nachgewiesenem *P. a.*, *C. n-a.* und war neben dem erwähnten Bezug zu *C. a.* positiv mit einer *S. m.* Kolonisation vergesellschaftet ($p=0,015$). (Vgl. Tab. 6a) Ausgehend von *A. f.* lieferten die Analysen eine signifikant positive Korrelation zu *A. n-f.* ($p=0,04$) und *P. a.* ($p<0,001$). (Vgl. Tab. 6b) Dies bedeutet, dass es einen positiven Zusammenhang von *A. f.* und der Co-Kolonisation der vorher genannten Keime gab. Des Weiteren zeigten sich signifikant positive Korrelationen zwischen *A. f.* und *S. m.* ($p<0,001$). Außerdem erwies sich, wie bereits für *C. a.* beschrieben, eine stark negative Verbindung zwischen einer *A. f.* Kolonisation und einem *H. i.* Nachweis ($p<0,001$).

Abbildung 2 veranschaulicht die obengenannte signifikante Korrelation von *P. a.* mit *A. f.* anhand der Tatsache, dass in der mit *P. a.* chronisch besiedelten Gruppe auch die höchste Prävalenz für eine *A. f.* Kolonisation gefunden wurde.

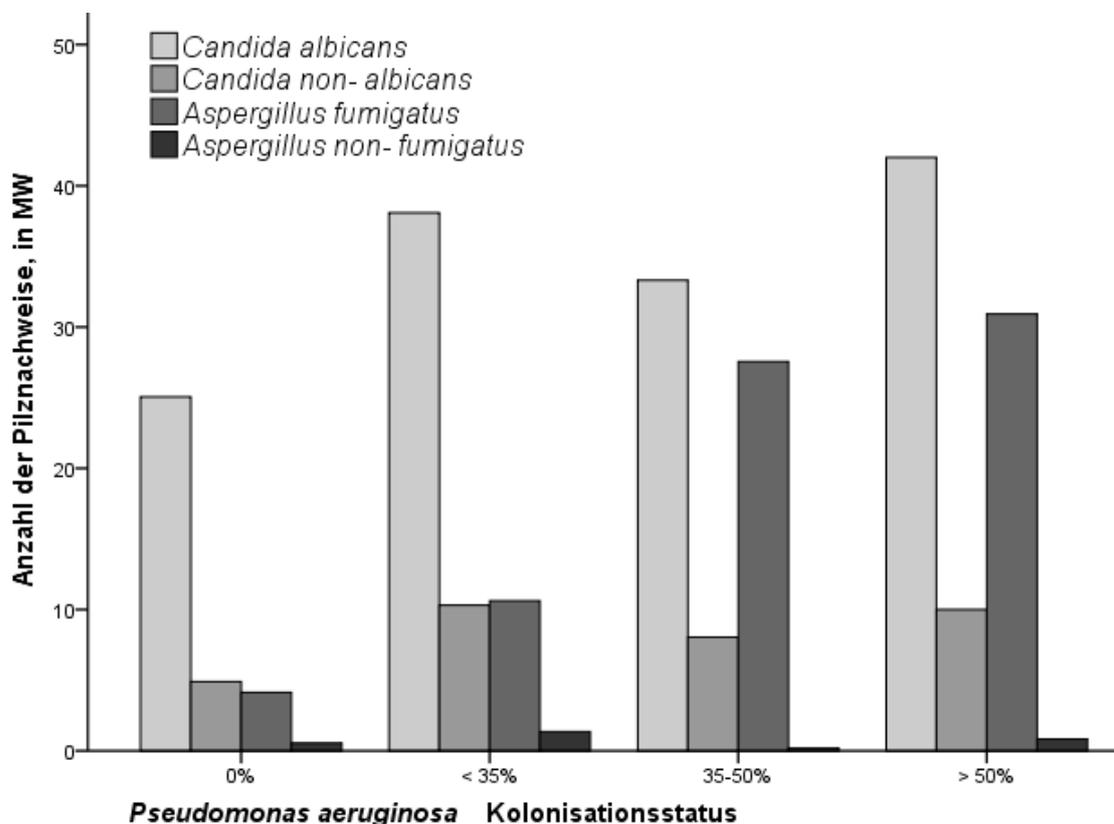


Abb. 2: Zusammenhang zwischen der prozentual gegliederten *Pseudomonas aeruginosa* Kolonisation und den vier Gruppen von positiven Pilznachweisen in Mittelwerten (MW), n=128

3.3 Erstmanifestation von *Candida* und *Aspergillus*

In die Auswertung der Pilzerstmanifestationen bezogen wir jeweils bei *C. a.* und bei weiteren *Candida* Spezies das Kriterium „Jünger 11“ mit ein. Dies schloss 46 Patienten, die das elfte Lebensjahr noch nicht erreicht hatten, in die Analyse mit ein. Dadurch stellten wir sicher, dass nicht solche Patientendaten das Ergebnis verfälschten, bei denen die Diagnose Mukoviszidose erst spät gestellt und deshalb der erste mikrobiologische Befund verspätet erhoben werden konnte. Die Analyse des Zeitpunkts in Lebensjahren, an dem erstmals ein Pilznachweises gelang, schloss 34 Patienten mit ein.

Der Nachweis von *C. a.* erfolgte im Mittel mit 2,12 Lebensjahren ($\pm 2,0$ Jahre), zuerst vor Vollendung des ersten Lebensjahres und spätestens im siebten Lebensjahr. (Abb. 3) Prozentual betrachtet, ergab dies, dass 67,6 % der betroffenen Patienten bei der ersten Manifestation mit *C. a.* zwei Jahre alt oder jünger waren. Bei den *Candida* Spezies ergab der MW des Pilzerstnachweises in Lebensjahren ein Alter von 2,71 Jahren ($\pm 2,72$ Jahre), wobei der späteste Nachweis mit neun Jahren erfolgte. Von 24 einbezogenen Altersangaben waren 66,7 % der Patienten bei Erstmanifestation maximal zwei Jahre alt.

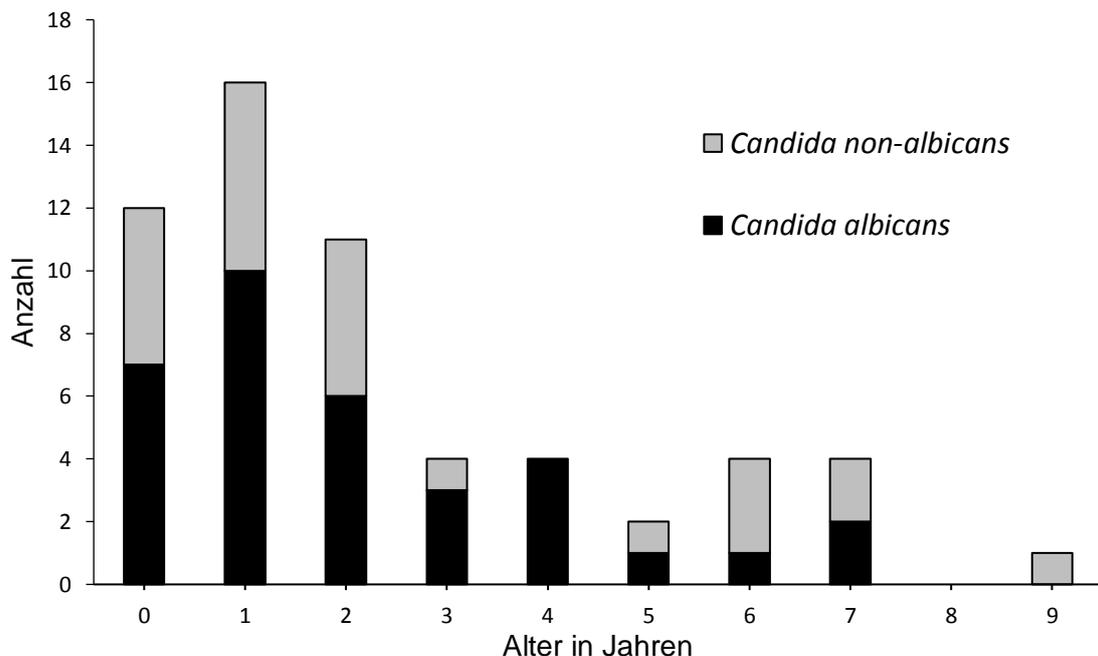


Abb. 3: Erstmanifestation von *Candida*, einbezogen sind alle Patienten unter elf Jahren, n=46; *Candida albicans* Nachweis: n=34 (schwarz), *Candida non-albicans* Nachweis: n=24 (grau)

Bei der *Aspergillus* Erstmanifestation wurden alle Patientendaten ohne Altersbeschränkung mit eingeschlossen, da laut verschiedener Studien ein Durchschnittsalter von ungefähr 13 Jahren für die Erstkolonisation mit *A. f.* angenommen werden konnte. Die Mittelwerte der Erstdiagnose betrugen bei unseren Patienten bei *A. f.* 13,07 Lebensjahre ($\pm 8,4$ Jahre) und bei *A. n-f.* 16,13 Lebensjahre ($\pm 8,2$ Jahre). Das niedrigste Alter, bei dem der Schimmelpilz nachweisbar war, lag bei *A. f.* bei unter einem Jahr und bei den weiteren *Aspergillus* Spezies unter zwei Jahren.

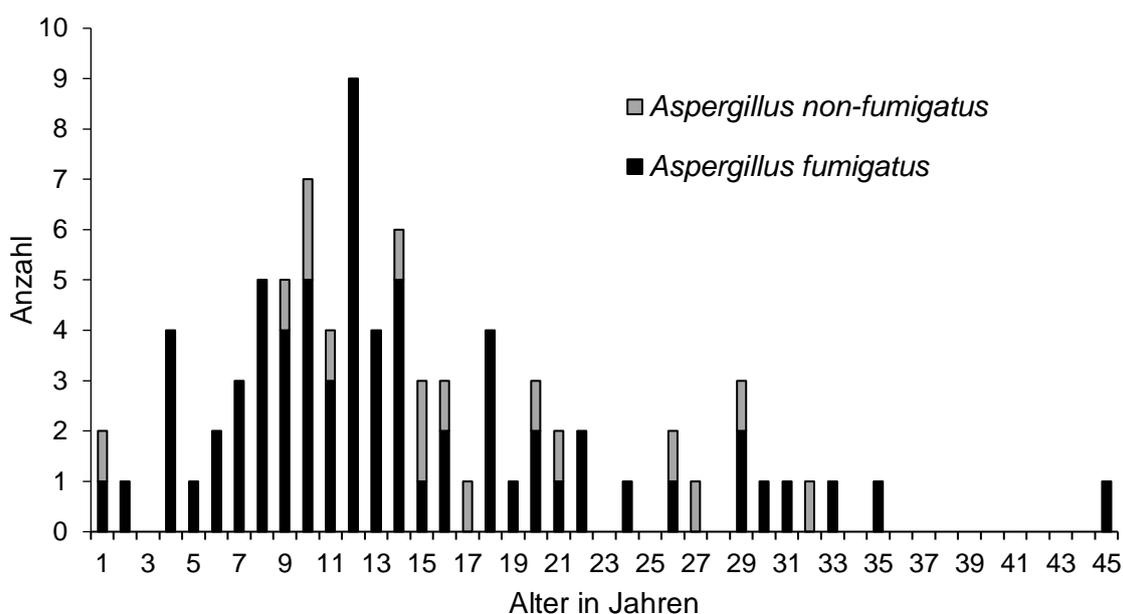


Abb. 4: Erstmanifestation von *Aspergillus*, einbezogen sind alle Patienten mit positivem *Aspergillus* Nachweis im gesamten Studienverlauf, n=69; *Aspergillus fumigatus* Nachweis: n=68 (schwarz), *Aspergillus non-fumigatus* Nachweis: n=17 (grau)

Die statistische Analyse ergab, dass das Alter der Patienten höchstsignifikant positiv mit dem Nachweis von *A. f.* ($p < 0,001$) korrelierte sowie signifikant mit dem von *A. n-f.* ($p = 0,019$) und *C. a.* ($p = 0,003$). Kein signifikanter Zusammenhang zeigte sich zwischen dem Alter in Lebensjahren und dem Nachweis von *C. n-a.*

Außerdem gab es höchstsignifikante positive Korrelationen ($p < 0,001$) zwischen dem Alter in Lebensjahren und dem Nachweis von *P. a.* und von *S. m.*

($p=0,02$), hingegen eine signifikant negative Korrelation mit einem Nachweis von *H. i.* ($p<0,001$).

3.4 Lungenfunktion

Die Lungenfunktion konnte mithilfe der Spirometrie-Untersuchung bei insgesamt 111 Patienten gemessen und dokumentiert werden. Bei 41 Patienten wurde die Untersuchung schon vor dem sechsten Lebensjahr durchgeführt, um den Therapiebedarf der Kinder möglichst früh einschätzen zu können. Für die Subpopulation dieser Kinder existieren im MUKO.DOK jedoch keine Normwerte, um aussagekräftige Vergleiche in der Altersklasse ziehen zu können.

Insgesamt wurden 2736 Spirometrie-Untersuchungen gespeichert, was durchschnittlich 20,2 Messungen pro Patient ergab. Wir errechneten von allen CF-Patienten im Gesamtverlauf eine durchschnittliche FEV1 von 89,2 % der Norm ($\pm 19,4$ %). Dies bedeutet, dass die gemittelte Lungenfunktion aller Patienten mindestens 10 % unter der Norm der gesunden Bevölkerung lag. Der schlechteste Mittelwert der FEV1 eines Patienten betrug 25 % und der Beste 130 % in der Perzentilenkurve. Die MEF₂₅ aller Patienten im Gesamtverlauf erreichte einen Durchschnittswert von 57,2 % bezogen auf die Norm Gesunder ($\pm 26,4$ %). Der niedrigste Durchschnittswert betrug 8 % und der Höchste 137 %.

Die Darstellung aller Mittelwerte der FEV1 und MEF₂₅ in Prozent der Norm in Abb. 5 zeigt zum einen, dass ein Großteil der eingetragenen Werte unter den 100 % der zu erwarteten Werte lagen. Zum anderen stellen sich die MEF₂₅ MW insgesamt deutlich niedriger als die FEV1 MW in Prozent der Norm dar.

Zusätzlich erkennt man anhand der Steigung der linearen Gleichungen, dass mit höherem Alter die Lungenfunktion der Patienten im Vergleich zur gesunden Bevölkerung stark abnimmt. Mathematisch ausgedrückt, ist der mittlere MEF₂₅%-Abfall mit $m = -1,29$ steiler als der mittlere FEV1%-Abfall mit $m = -1,03$.

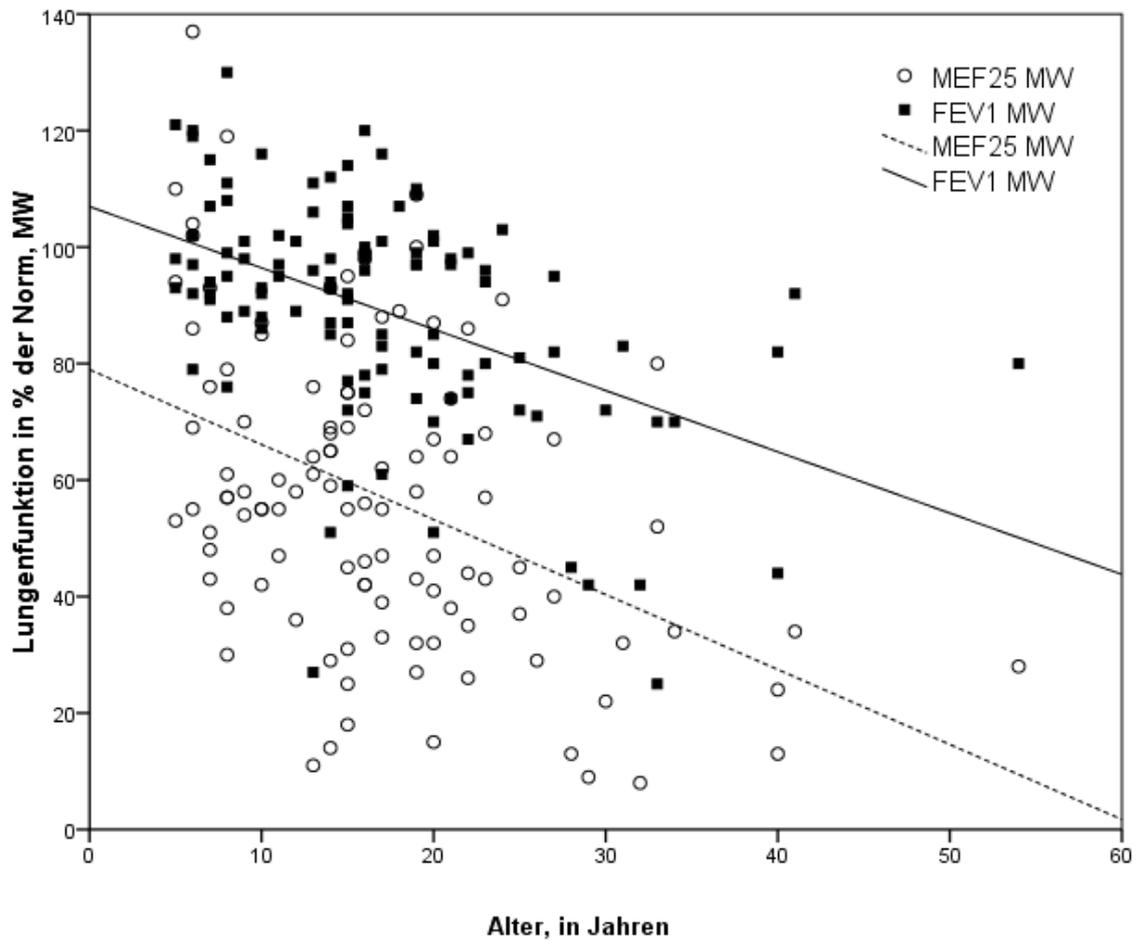


Abb. 5: Lungenfunktion in Korrelation zum Alter mit FEV1% MW und MEF₂₅% MW; FEV1%: forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen in % der Norm, MEF₂₅%: maximal expiratorischer Fluss bei 25 % der forcierten Vitalkapazität in % der Norm; MW: Mittelwert; lineare Gleichung des FEV1%-Abfalls im Bezug zum Alter mit der Steigung $m = - 1,03$, lineare Gleichung der MEF₂₅% MW mit der Steigung $m = - 1,29$; $n=111$

Zieht man den Kolonisationsstatus von Hefe- und Schimmelpilzen in die statistischen Analysen der Lungenfunktion mit ein, errechneten wir folgende Ergebnisse. Mit $p=0,006$ lag ein positiver Zusammenhang zwischen FEV1%-Abfall und Kolonisationsstatus von *C. a.* vor, jedoch nicht bezüglich *C. n-a.* Das heißt, eine schlechtere Lungenfunktion war mit einem häufigeren *C. a.* Kolonisationsnachweis assoziiert.

Ähnlich zeigt die Untersuchung der MEF₂₅%-Werte, dass diese signifikant negativ mit einer *C. a.*-Kolonisation ($p=0,022$), aber nicht mit *C. n-a.* zusammenhängen. (Abb. 6 und 7, Tab. 6a)

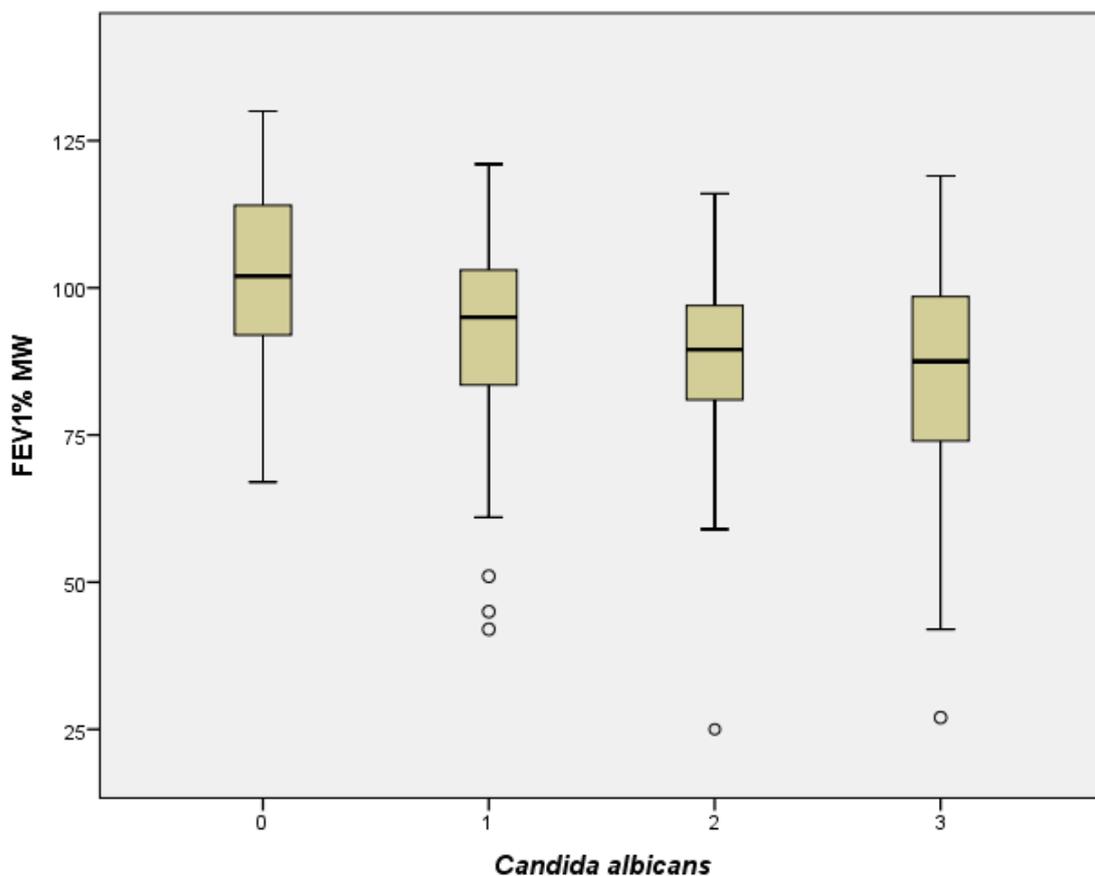


Abb. 6: FEV1% MW in Abhängigkeit vom *Candida albicans* Kolonisationsstatus, FEV1% MW: Mittelwert des forcierten expiratorischen Einsekundenvolumens in % der Norm; 0: nie, 1: selten, 2: intermittierend, 3: chronisch positiver Pilznachweis, Vgl. Tab. 2; n=111

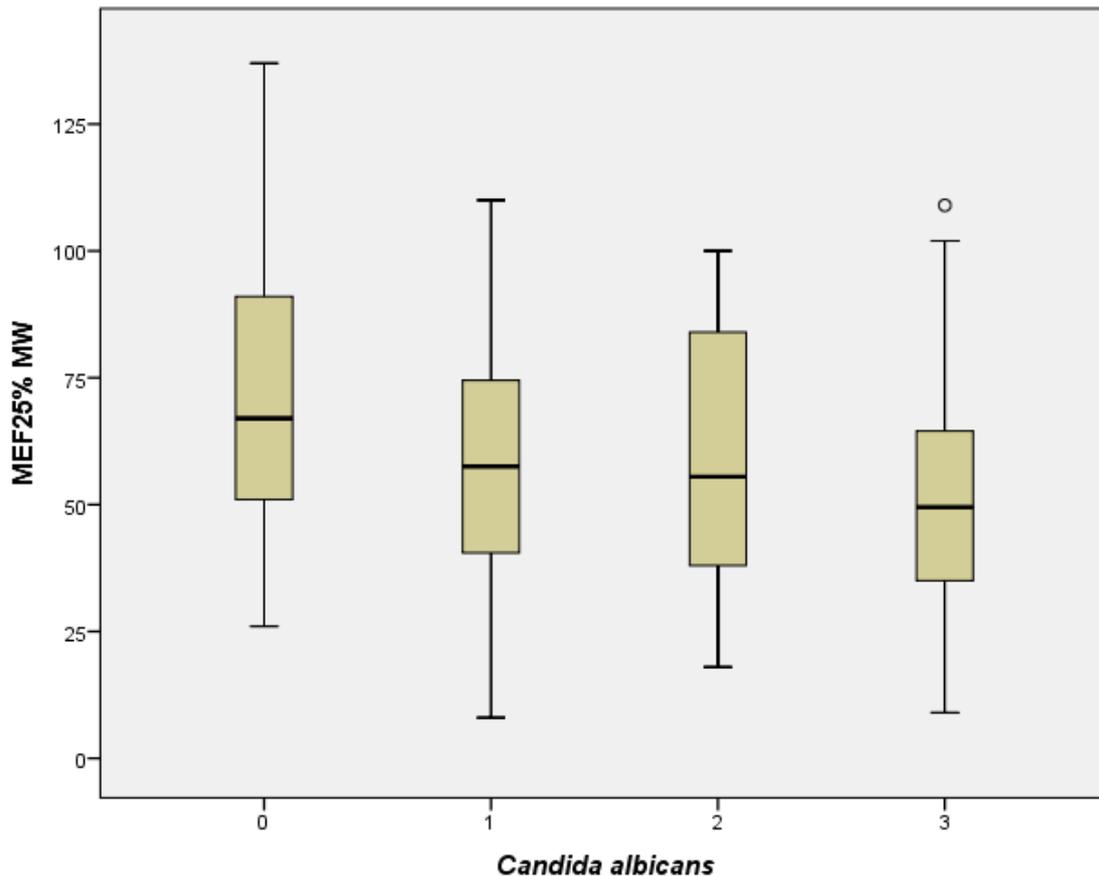


Abb. 7: MEF_{25%} MW in Abhängigkeit vom *Candida albicans* Kolonisationsstatus
 MEF_{25%} MW: Mittelwert des maximal expiratorischen Flusses bei 25 % der forcierten Vitalkapazität in % der Norm; 0: nie, 1: selten, 2: intermittierend, 3: chronisch positiver Pilznachweis, Vgl. Tab. 2; n=111

Auch bei der Kolonisation mit *A. f.* bzw. weiteren *Aspergillus* Spezies konnte eine signifikante Assoziation mit einem FEV₁%-Abfall ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,014$) nachgewiesen werden. Bezüglich einer abnehmenden MEF_{25%} wurde für *A. f.* ein signifikantes Ergebnis errechnet ($p < 0,001$). Dasselbe gilt für *A. n-f.* ($p = 0,024$). Das bedeutet, dass in den dokumentierten Fällen *Aspergillus* Nachweise mit einer schlechteren Lungenfunktion vergesellschaftet waren. (Abb. 8 und 9, Tab. 6b)

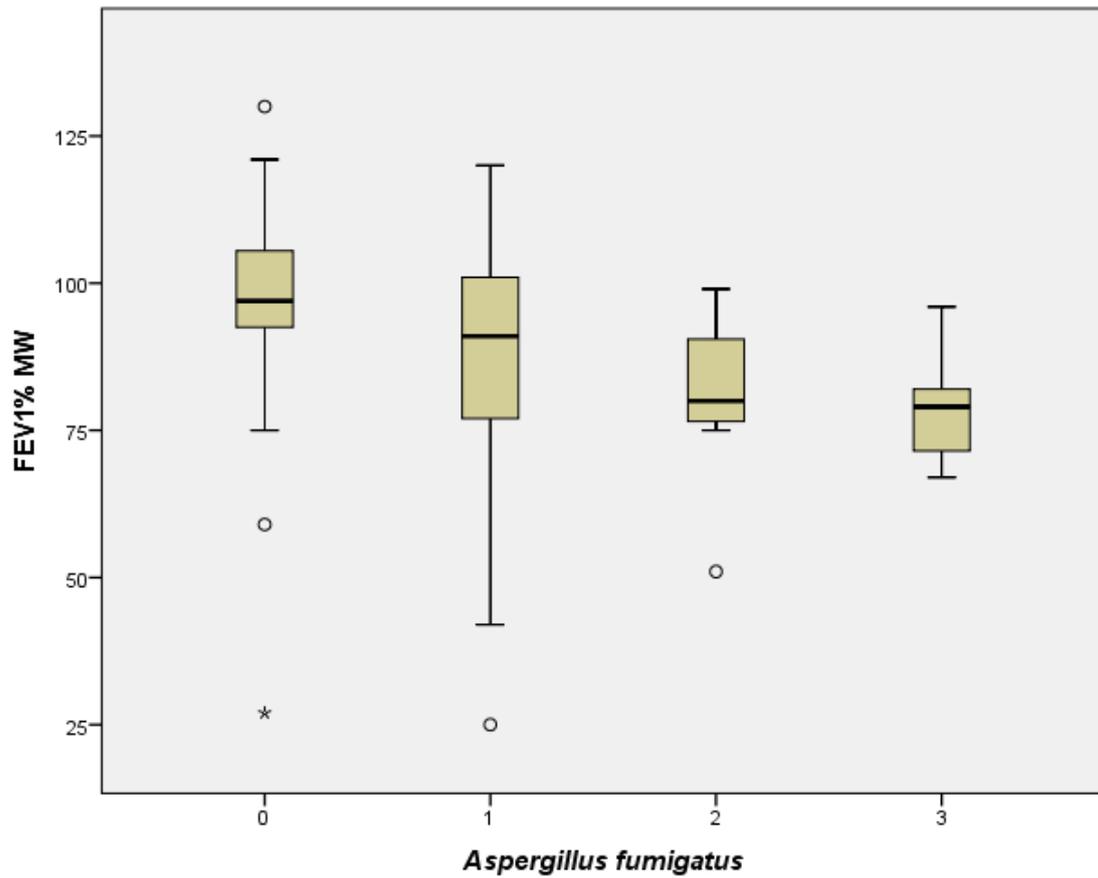


Abb. 8: FEV1% MW in Abhängigkeit vom *Aspergillus fumigatus* Kolonisationsstatus FEV1% MW: Mittelwert des forcierten expiratorischen Einsekundenvolumens in % der Norm; 0: nie, 1: selten, 2: intermittierend, 3: chronisch positiver Pilznachweis, Vgl. Tab. 2; n=111

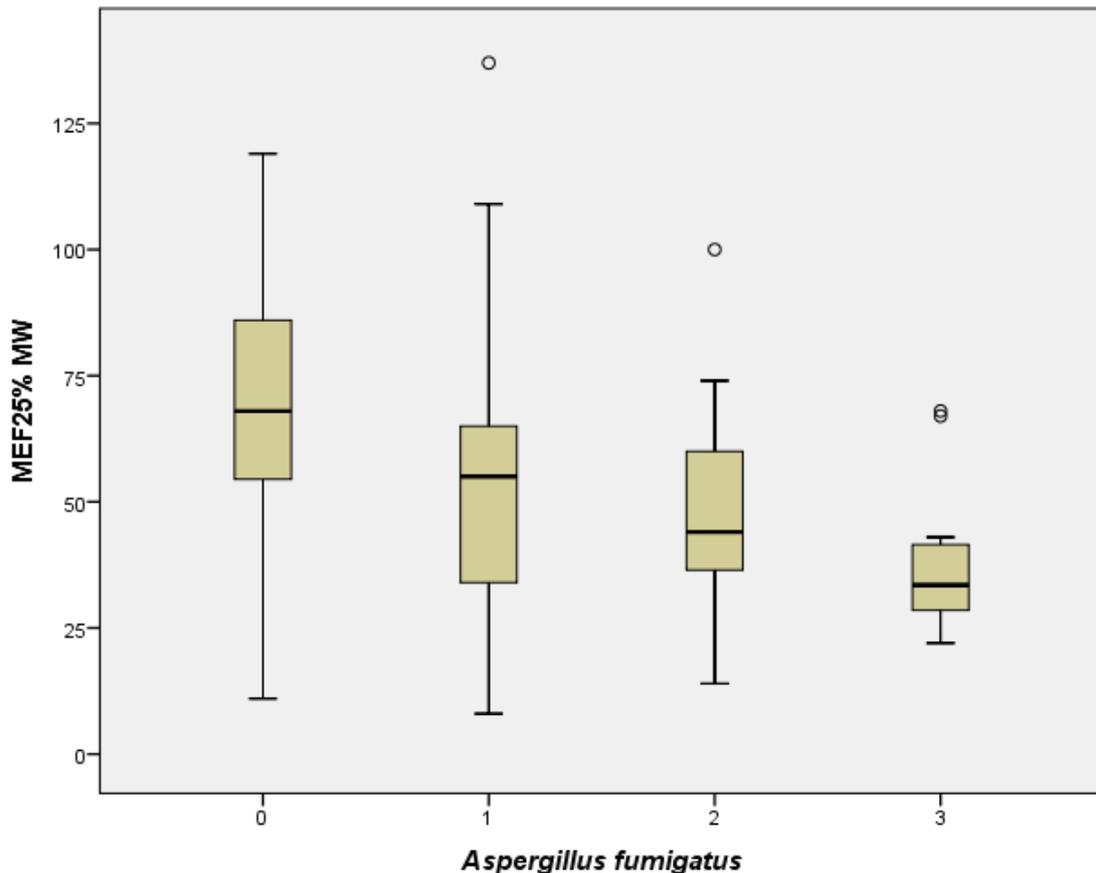


Abb. 9: MEF₂₅% MW in Abhängigkeit vom *Aspergillus fumigatus* Kolonisationsstatus MEF₂₅% MW: Mittelwert des maximal expiratorischen Flusses bei 25 % der forcierten Vitalkapazität in % der Norm; 0: nie, 1: selten, 2: intermittierend, 3: chronisch positiver Pilznachweis, Vgl. Tab. 2; n=111

Unter Einbeziehung bakterieller Nachweise, ergaben die Analysen hochsignifikante Zusammenhänge zwischen FEV₁%- sowie MEF₂₅%-Abfall und steigendem Kolonisationsstatus von *P. a.* ($p < 0,001$).

Bezüglich einer *H. i.* Besiedlung zeigte sich jedoch eine negative Korrelation zu abfallenden Lungenfunktionswerten. Keine signifikanten Korrelationen konnten zwischen der Lungenfunktion und dem mikrobiologischen Nachweis von *S. a.* oder *S. m.* in den Abstrichen der Patienten erkannt werden.

3.5 BMI

In die Auswertung des BMIs bezogen wir insgesamt 3972 BMI Werte mit ein. In zehn Jahren wurden pro Patient im Durchschnitt 31 BMI Werte dokumentiert. Der Mittelwert des BMIs aller eingeschlossenen 128 Patienten betrug 17,2 kg/m² mit einer SA von 2,6. Dabei lag der niedrigste BMI im Querschnitt bei 13,2 kg/m² und der höchste hingegen bei 26,8 kg/m².

Die Analyse der Mittelwerte des BMI in Prozent der Norm (BMI% MW) lieferte eine breite Spannweite von 0,1 %, als niedrigsten Wert, bis 91,8 % als höchsten Wert. Die Perzentilenkurve betrachtend lag der Durchschnittswert aller Patienten im Bereich der 35. Perzentile mit einer SA von 23,9. 14,1 % der Patienten fielen mit ihrem BMI% MW unter die 10. Perzentile der Gesamtbevölkerung und waren damit definitionsgemäß untergewichtig.

Abb. 10 a) zeigt den Zusammenhang zwischen höherem Alter und einem Anstieg des BMIs. Deren Korrelation war mit $p < 0,001$ signifikant. In Abb. 10 b) ist der Mittelwert aller prozentualen BMI Werte pro Patient dargestellt, um den natürlichen Anstieg des BMIs im Verlauf der Adoleszenz auszuschließen. Man erkennt, dass die Patienten mit höherem Alter, bis auf drei Ausreißer (*), im Vergleich zu den Jüngeren etwas niedrigere Perzentilen Werte erreichten. Die Regressionsgleichung $y = 16,73 - 0,06 * x$ mit der Steigung $m = -0,06$ bestätigt dies mathematisch.

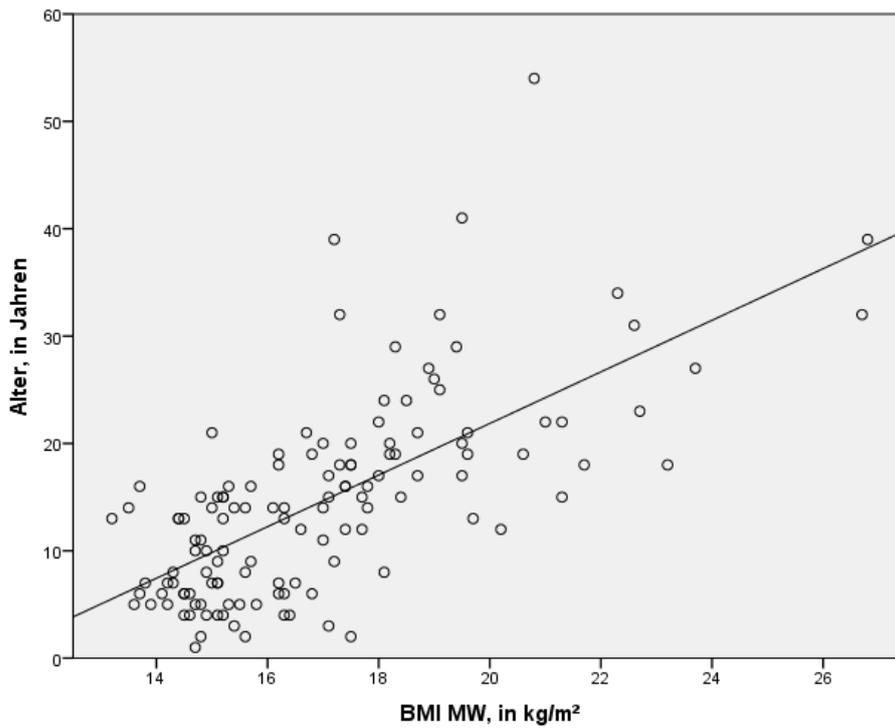


Abb. 10a: Zusammenhang zwischen den BMI Mittelwerten (MW) in kg/m² und dem Alter in Jahren, n=128

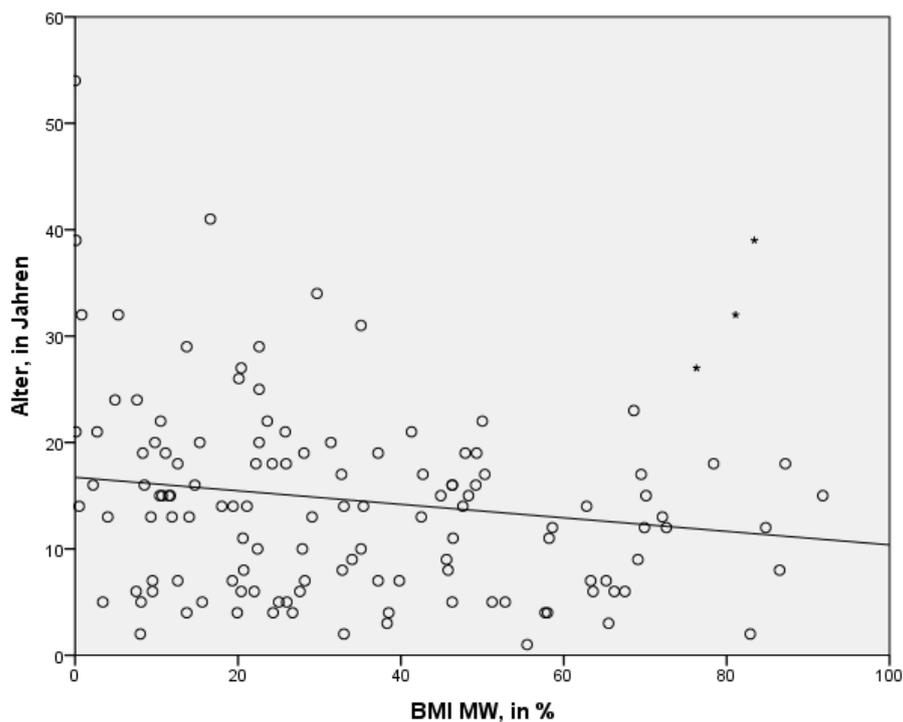


Abb. 10b: Zusammenhang zwischen den BMI Mittelwerten (MW) in Prozent der Norm und dem Alter in Jahren, n=128; Gleichung der Geraden: $y = 16,73 - 0,06 * x$; * : Ausreißer

Abbildung 11 zeigt den Zusammenhang zwischen den durchschnittlichen BMI Werten einzelner Patienten und dem Schweregrad der Lungenfunktions-einschränkung. Hier sieht man, dass eine eingeschränkte Lungenfunktion mit einem niedrigeren BMI assoziiert war. Die Korrelationsanalysen bestätigten diese Tatsache mit $p < 0,001$.

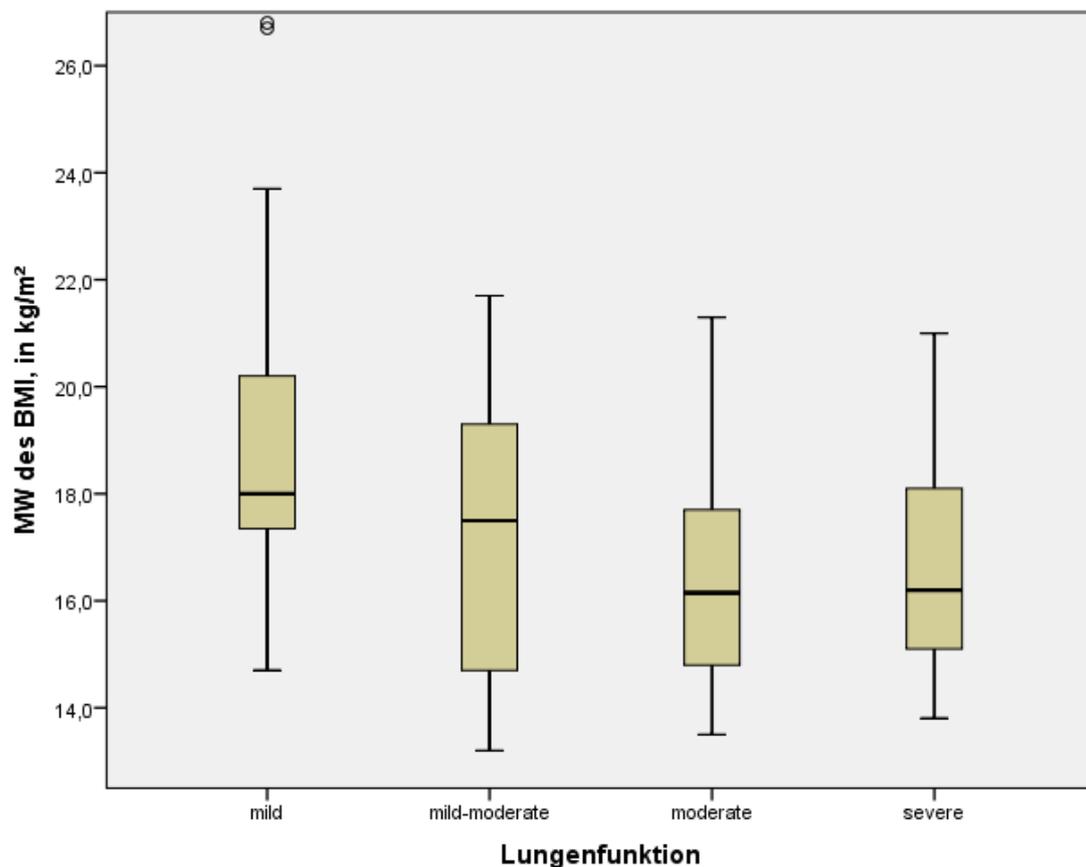


Abb. 11: Zusammenhang zwischen den BMI Mittelwerten (MW) der Patienten vom gesamten Verlauf und dem Schweregrad der Lungenerkrankung, Einteilungskriterien in mild, mild-moderate, moderate und severe (Vgl. Tab. 12 im Anhang)

In Bezug auf die fungalen Kolonisationen lieferten die Korrelationsanalysen einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen dem BMI% MW und dem Kolonisationsstatus von *A. f.* ($p=0,047$) sowie dem von *A. n-f.* ($p=0,01$). Ein häufiger *Aspergillus* Nachweis war somit mit einem niedrigeren BMI assoziiert. Wohingegen bei *C. a.* oder weiteren Keimen, wie *P. a.* oder *H. i.* kein Zusammenhang zum BMI gezeigt werden konnte.

Tab. 6a: Korrelationen zwischen dem Kolonisationsstatus von *Candida* und den klinischen Parametern

Klinische	<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	<i>Candida</i>	<i>non-albicans</i>
Parameter	Pearson Ko.- koeffizient <i>r</i>	p-Wert	Pearson Ko.- koeffizient <i>r</i>	p-Wert
Alter	0,258	0,003	0,073	0,416 n.s.
FEV1%	-0,258	0,006	-0,107	0,266 n.s.
MEF ₂₅ %	-0,217	0,022	-0,062	0,521 n.s.
BMI%	-0,075	0,397 n.s.	-0,057	0,520 n.s.
C. a.	-	-	0,235	0,007
C. n-a.	0,235	0,007	-	-
A. f.	0,177	0,046	0,127	0,153 n.s.
A. n-f.	0,189	0,033	0,107	0,231 n.s.
P. a.	0,166	0,610 n.s.	0,142	0,110 n.s.
S. a.	0,075	0,401 n.s.	-0,003	0,970 n.s.
H. i.	-0,209	0,018	-0,081	0,365 n.s.
S. m.	0,056	0,531 n.s.	0,214	0,015

Abkürzungen s. Tab. 6b

Tab. 6b: Korrelationen zwischen dem Kolonisationsstatus von *Aspergillus* und den klinischen Parametern

Klinische	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>non-fumigatus</i>
Parameter	Pearson Ko.- koeffizient <i>r</i>	p-Wert	Pearson Ko.- koeffizient <i>r</i>	p-Wert
Alter	0,600	<0,001	0,207	0,019
FEV1%	-0,339	<0,001	-0,233	0,014
MEF ₂₅ %	-0,369	<0,001	-0,213	0,024
BMI%	-0,176	0,047	-0,226	0,010
C. a.	0,177	0,046	0,189	0,033
C. n-a.	0,127	0,153 n.s.	0,107	0,231 n.s.
A. f.	-	-	0,252	0,004
A. n-f.	0,252	0,004	-	-
P. a.	0,438	<0,001	0,072	0,416 n.s.
S. a.	0,131	0,140 n.s.	0,134	0,130 n.s.
H. i.	-0,426	<0,001	-0,121	0,173 n.s.
S. m.	0,384	<0,001	0,119	0,181 n.s.

FEV1%: forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen in Prozent der Norm, MEF₂₅%: maximal expiratorischer Fluss bei 25 % der forcierten Vitalkapazität in % der Norm, BMI%: Body Mass Index in Prozent der Norm, *C. a.*: *Candida albicans*, *C. n-a.*: *Candida non-albicans*, *A. f.*: *Aspergillus fumigatus*, *A. n-f.*: *Aspergillus non-fumigatus*, *P. a.*: *Pseudomonas aeruginosa*, *S. a.*: *Staphylococcus aureus*, *H. i.*: *Haemophilus influenzae*, *S. m.*: *Stenotrophomonas maltophilia*, n.s.= nicht signifikant

3.6 Allergologie

Die Untersuchung der Gesamt IgE Messungen im Serum der Patienten ergab bei 109 (85,16 %) Erkrankten im Querschnitt ein Gesamt IgE < 500 kU/l. Sieben Patienten (5,47 %) erreichten Werte zwischen 500 und 1000 kU/l und zwölf Patienten (9,38 %) Gesamt IgE Werte über 1000 kU/l. (Tab. 7)

Mit statistischen Analysen konnte ein positiver Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und höheren Gesamt IgE Werten im Serum nachgewiesen werden ($p=0,028$). Bezüglich der fungalen Kolonisation wurde lediglich eine positive Tendenz zwischen höheren IgE Werten und steigenden *A. n.f.* Besiedlungen gezeigt ($p=0,069$).

Tab. 7: Einteilung und Häufigkeiten von Gesamt IgE, n=128

Gruppe	Gesamt IgE, in kU/l	Anzahl	in %
0	< 500	109	85,16
1	≥ 500, < 1000	7	5,47
2	≥ 1000	12	9,38

Tabelle 8 demonstriert die Ergebnisse der spezifisch auf *A. f.* gebildeten IgE-Antikörper. Bei circa 40 % der 125 Patienten konnten Antikörper spezifisch gegen *A. f.* nachgewiesen werden. Die Messdaten der einbezogenen Patienten verteilten sich auf die RAST-Klassen 0 bis 4. Die RAST-Klassen 5 und 6 wurden in einzelnen Fällen dokumentiert, aber kein Patient lieferte im gesamten Verlauf einen Mittelwert von über 52,5 kUA/l.

Tab. 8: Einteilung und Häufigkeiten von spezifisch gegen *Aspergillus fumigatus* (*A. f.*) gerichteten IgE, n=125

Klasse	<i>A. f.</i> IgE, in kUA/l	Anzahl	Häufigkeit, in %
0	0-0,19	76	60,8
1	0,2-0,69	13	10,4
2	0,7-3,49	10	8,0
3	3,5-17,49	18	14,4
4	17,5-52,49	8	6,4
5	52,5-99,99	0	0
6	>100	0	0

Statistisch gesehen lag kein Zusammenhang zwischen dem Kolonisationsstatus von *A. f.* und dem spezifisch gegen *Aspergillus* gerichteten IgE vor. Es zeigte sich jedoch, dass die Maximalwerte spezifischer Antikörper bei Patienten der Kolonisationsgruppe 1 gefunden wurden. Kolonisationsgruppe 1 beinhaltet die Patienten, bei denen weniger als 35 % aller mikrobiologischen Untersuchungen positiv auf *A. f.* getestet wurden. Niedrigere IgE Werte fanden sich in der mit *A. f.* intermittierend oder chronisch kolonisierten Patientengruppe.

Die weiteren *Aspergillus* Spezies gingen tendenziell ($p=0,063$) mit erhöhten Spiegeln von spezifisch gegen *A. f.* gerichteten IgE Antikörpern einher, während *C. a.* einen signifikanten Zusammenhang ($p=0,36$) zu diesen spezifischen IgE Antikörpern aufzeigt. Eine deutliche positive Korrelation ($p<0,001$) konnte zwischen den spezifischen *A. f.* IgE und dem Gesamt IgE berechnet werden.

3.7 ABPA

Die Diagnose ABPA wurde anfangs bei sieben aller Tübinger Patienten gestellt. Bei zwei Patienten konnte sie jedoch widerlegt werden, sodass insgesamt bei 3,9 % der eingeschlossenen Patienten eine ABPA sicher bestätigt werden konnte. Aufgrund der niedrigen Prävalenz führten wir nur eine deskriptive Statistik durch und verzichteten auf statistische Analysen.

Zum Auswertungszeitpunkt lag das Durchschnittsalter der ABPA-positiven Patienten bei 15,4 Jahren und die Geschlechterverteilung ergab drei männliche und zwei weibliche Patienten. Drei der Betroffenen waren homozygote und zwei heterozygote Träger bezüglich der F Δ 508-Mutation. Bei vier der betroffenen Patienten wurde *A. f.* mehrfach nachgewiesen und bei zwei von ihnen war *A. terreus* der häufigste Pilz der *Aspergillus* Spezies. Die Gesamt IgE Werte fanden sich im Verlauf bei allen fünf Patienten über 1000 kU/l und die spezifischen *Aspergillus* IgE lagen durchschnittlich über 26,9 kUA/l, was der Gruppe 4, Vgl. Tab. 8, entspricht. Eine ABPA-Patientin zeigte nie *Aspergillus* positive Befunde in der mikrobiologischen Messung, jedoch spezifisch gegen *A. f.* gerichtete IgE Antikörper.

In Hinblick auf die medikamentöse Therapie wurden alle ABPA-Patienten mit Antimykotika und vier der fünf Betroffenen mit Corticosteroiden behandelt.

3.8 Medikamentöse Therapie

Über den gesamten Zeitraum von zehn Jahren wurden 14 von 128 Patienten (10,9 %) mit Antimykotika therapiert. Hier wurde bevorzugt Itraconazol, Sempera® als Kapseln oder Liquid verschrieben, sowie in Einzelfällen Voriconazol, VFEND® in Tablettenform.

Die Dokumentation der antibiotischen Therapie zeigte, dass 30 Patienten (23,4 %) chronisch mit inhalativen Antibiotika behandelt wurden. Chronisch bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Therapie länger als ein Jahr betrug. 57 weitere Patienten (44,5 %) wurden intermittierend therapiert, d. h. die inhalative Antibiotikatherapie war auf weniger als ein Jahr beschränkt. Eingesetzt wurden vor allem das Aminoglycosid Tobramycin und das Polymyxin Antibiotikum Colistin, welches Patienten mit Mukoviszidose insbesondere bei einem *Pseudomonas* Nachweis verschrieben wird.

Eine Azithromycin Behandlung per os erhielten elf Patienten und zehn der CF-Patienten wurden mit Corticosteroiden in einer Langzeittherapie von länger als sechs Monaten therapiert.

Die Korrelationsanalyse zwischen der Medikation und der Keimbeseidlung ergab, dass die Inhalation von Antibiotika positiv mit dem Kolonisationsstatus von *A. f.*, *C. a.* und dem Befall von *P. a.* assoziiert war, s. Tab. 9. Ein signifikanter Zusammenhang bezüglich der antimykotischen Therapie und einer Pilzkolonisation konnte nur bei *A. n-f.* gezeigt werden. Bezüglich der systemischen Azithromycin Therapie wurde nur eine positive Korrelation zu *P. a.* und *A. n-f.* bestätigt. Die Corticosteroid-Langzeittherapie war positiv mit der Diagnose CFRD mit einer Tendenz von $p=0,064$ assoziiert.

Tab. 9: Übersicht der medikamentösen Therapie im Bezug zu den spezifischen fungalen Kolonisationen

Therapie	Azole	Cortico-steroide	Inhalative Antibiotika	Azithromycin
Häufigkeit	10,9 %	7,8 %	67,9 %	8,6 %
Korrelationen zwischen den nachfolgenden Pilzen mit der oben genannten Medikation, in p = 2-seitigem Signifikanzniveau				
C. a.	0,771	0,237	0,018*	0,349
C. n-a.	0,756	0,827	0,177	0,335
A. f.	0,472	0,758	0,000**	0,167
A. n-f.	0,001*	0,000*	0,849	0,018*
P. a.	0,627	0,307	0,000**	0,003**

C. a.: *Candida albicans*, *C. n-a.*: *Candida non-albicans*, *A. f.*: *Aspergillus fumigatus*, *A. n-f.*: *Aspergillus non-fumigatus*, *P. a.*: *Pseudomonas aeruginosa*; * : p<0,05, ** : p<0,01

4. Diskussion

4.1 Fungale Kolonisation

Fungalen Kolonisationen und Infektionen bei Patienten mit Mukoviszidose ist in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt worden. Die Ursachen und die Pathogenität des Pilzbefalls sind jedoch noch lange nicht genug erforscht. (45) Besonders *C. a.* und weitere *Candida* Spezies wurden vermehrt in den Atemwegen von CF-Patienten nachgewiesen. (17)

Bei den Tübinger CF-Patienten waren die am häufigsten gefundenen Pilze in Sputumproben und Rachenabstrichen: *C. a.*, gefolgt von *C. n-a.*, *A. f.* und *A. n-f.* Spezies. Bei 86 % der Patienten konnten wir mindestens einmal *C. a.* nachweisen. Im Vergleich zu weiteren *C.* Spezies und der Gruppe der *Aspergillus* zeigt die Hefe hohe Werte für intermittierende und chronische Besiedlungen, Vgl. Abb. 1.

Tabelle 10 zeigt die Prävalenzwerte von *Candida* von 1987 bis 2014. Der Nachweis der Hefe schien im Vergleich zu 1987 stark angestiegen und in den letzten Jahren relativ konstant geblieben zu sein. Weitere *C. n-a.* wurden in den ausgewählten Studien häufig nur einzeln erwähnt und nicht in Prozentzahlen genannt, sodass die Möglichkeit, Vergleiche zu ziehen, beschränkt ist.

Tab. 10: *Candida albicans* und *Candida* Spezies in Sputum oder tiefen Pharyngealabstrichen von CF-Patienten in verschiedenen Zentren

Autor	Land	Jahr	n	Alter, MW	<i>C. a.</i> positiv,	<i>C. Spezies</i> positiv
Bauernfeind (46)	Deutschland	1987	102	16	26,4 %	k. A.
Hoppe (47)	Deutschland	1995	50	11,8	78,0 %	k. A.
Máiz (38)	Spanien	2001	76	15,3	87,9 %	k. A.
Bakare (16)	Deutschland	2002	94	28,5	75,5 %	k. A.
Valenza (15)	Deutschland	2007	60	18	78,3 %	> 8,3 %
Chotirmall (26)	Irland	2010	89	25,1	60,7 %	k. A.
Güngör (37)	Türkei	2012	48	11,6	62,5 %	> 12,5 %
Masoud-Landgraf (48)	Österreich	2014	113	20,3	74,3 %	k. A.

Als *Candida* positiv werden die Patienten bezeichnet, die im Verlauf mindestens einmal einen positiven *Candida*-Nachweis verzeichnet haben; k. A. = keine Angabe

Unsere Häufigkeitsreihenfolge der weiteren *Candida* Spezies begonnen mit *C. a.*, gefolgt von *C. dubliniensis* und *C. parapsilosis* stimmt mit Studien aus Belfast und Graz überein. (45, 48)

A. f., der am zweithäufigsten bei CF im Sputum vorkommende Pilz, konnte bei 53,9 % der Tübinger Patienten mindestens einmal nachgewiesen werden. Mortensen et al beschrieb die Häufigkeit der Schimmelpilze in gleicher Reihenfolge wie wir, begonnen mit *A. f.*, gefolgt von *A. flavus* und *A. terreus*, jedoch in niedrigeren Prävalenzen. (31) Im Vergleich zu *Candida* zeigte der Schimmelpilz deutlich seltener chronische Verläufe in den Atemwegen der Betroffenen. Weitere *Aspergillus* Spezies wurden selten zusammenfassend genannt.

Tabelle 11 zeigt die Prävalenzen von *Aspergillus* von 1987 bis 2014. Ausgehend von den aufgelisteten Studien wurden bisher nur in Deutschland und Spanien ähnlich hohe und in Österreich mit 78,8 % die höchsten Prävalenzwerte notiert. (15, 38, 48)

Tab. 11: *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus* Spezies in Sputum oder tiefen Pharyngealabstrichen von CF-Patienten in verschiedenen Zentren

Autor	Land	Jahr	n	Alter, MW	A. f. positiv	A. Spezies positiv
Bauernfeind (46)	Deutschland	1987	102	16	5,90 %	k. A.
Hoppe (47)	Deutschland	1995	50	11,8	10,0 %	k. A.
Máiz (38)	Spanien	2001	76	15,3	60,6 %	k. A.
Valenza (12)	Deutschland	2007	60	18	58,3 %	10,0 %
Sudfeld (49)	USA	2009	614	20	36,3 %	26,1 %
Mortensen (31)	Dänemark	2011	287	20	33,0 %	k. A.
Güngör (37)	Türkei	2012	48	11,6	10,4 %	8,3 %
Masoud-Landgraf (48)	Österreich	2014	113	20,3	78,8 %	k. A.

Als *Aspergillus* positiv werden die Patienten bezeichnet, die im Verlauf mindestens einmal einen positiven *Aspergillus*-Nachweis verzeichnet haben; k. A. = keine Angabe

Sudfeld erkannte in seiner Studie eine stetige Zunahme von Fadenpilzen von 2,0 % im Jahr 1997 auf 28,7 % im Jahr 2007 und nahm als Ursachen ein höheres Alter sowie vermehrt eingesetzte orale Antibiotika an. (49) Diesen Anstieg konnten wir bezogen auf Deutschland ebenfalls mit unseren Recherchen in Tab. 11 bestätigen. Eine stetige Zu- bzw. Abnahme der

nachgewiesenen fungalen Kolonisationen auf globaler Ebene konnten wir jedoch nicht identifizieren.

Die starken Unterschiede in den verzeichneten Pilz Prävalenzen konnten einerseits durch neuere technische Nachweisverfahren mit unterschiedlichen Nährmedien und dem Einsatz selektiver Bakterienhemmung begründet werden. (50) Beispielsweise wurde *C. dubliniensis* im Jahr 2002 bei CF-Patienten erstmals in relativ hohen Zahlen nachgewiesen, was jedoch nur durch spezifische Nährböden gelungen war. (51) In einer österreichischen Studie wurde außerdem gezeigt, dass der Pilznachweis durch konventionelle Methoden verglichen mit neueren Homogenisierungsverfahren bei 24 % der Patienten negativ war und somit durch ältere Methoden falsche Ergebnisse erbracht wurden. (48)

Andererseits spielten die verschiedenen eingeschlossenen Altersklassen, Krankheitszustände und lange Antibiotika- oder Corticosteroidtherapien der Patienten eine weitere Rolle für die differierenden Pilzhäufigkeiten. (16, 45) Außerdem wurden geografische Ursachen für unterschiedlich hohe fungale Nachweise angenommen, da abhängig vom Expositionsausmass in ländlichen Gegenden die Patienten höhere Pilznachweise erbrachten als in dichteren Besiedlungsgebieten. (52)

Bormann et al und viele weitere appellierten für eine standardisierte und routinierte spezifische Pilzdiagnostik. So könnte man genauere epidemiologische Aspekte von CF-Patienten identifizieren, effektivere Therapieentscheidungen treffen und bessere Vergleiche zwischen verschiedenen Zentren ermöglichen. (16, 46, 53, 54)

Ein Kritikpunkt an der mikrobiologischen Diagnostik in Tübingen ist, dass viele Kinder noch zu jung waren, um Sputum produzieren zu können. Bei diesen musste deshalb häufig ein tiefer Rachenabstrich für den Keimnachweis entnommen werden. Laut Armstrong gebe ein Rachenabstrich jedoch nicht den wahren Kolonisationsstatus der untersuchten Lungen wieder. Eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) wäre eine zuverlässigere Methode zur exakten Bestimmung der Keimkolonisation in den Bronchien. (55) Diese ist aber

aufgrund der Invasivität, des Aufwands und der mangelnden Kooperation junger Patienten im klinischen Alltag nicht routiniert durchführbar. Eine Cochrane Studie berichtete dazu, dass es keine deutliche Evidenz für ein besseres Ergebnis durch eine BAL bei Vorschulkindern im Vergleich zu den Standardmethoden des Keimnachweises bei CF-Patienten gäbe. Für Jugendliche oder Erwachsene fehlen bis dato ähnliche Studien. (56)

Eine Schwachstelle des Vergleichs zwischen den Pilzkolonisationen war, dass es noch keine einheitlichen Einteilungen für den Kolonisationsstatus gab, um die Pilzhäufigkeiten objektivierbar vergleichen zu können. Manche Zentren werteten den einmaligen Nachweis als positiven Befund, andere involvierten mehrere mikrobiologische Ergebnisse in die Statuseinteilung. (26, 28)

4.2 Erstmanifestation

Die Untersuchung des ersten Pilznachweises zeigt in Abb. 3, dass die primäre Manifestation von den *Candida* Spezies häufig schon vor dem 2. Lebensjahr stattfand. Das ermittelte Ergebnis ist jedoch kritisch zu betrachten, da das Auswahlkriterium „Jünger 11“ das Ergebnis durch den Wegfall der späteren Erstkolonisationen eventuell verfälschen könnte. Hier wäre eine Analyse aller Patientendaten von Geburt an wünschenswert. Diese war jedoch mit unserem Studiendesign über einen Zeitraum von 10 Jahre nicht möglich, da nicht alle Patientendaten seit Erstkontakt eingeschlossen worden sind. Vergleichswerte bezüglich der Erstmanifestation mit *C. a.* sind uns bei Patienten mit Mukoviszidose nicht bekannt.

Die Prävalenz von *A. f.* schien in der frühen Kindheit niedrig gewesen zu sein, während sie mit steigendem Alter zunahm. (15, 49) Dies wurde auch in zwei französischen CF-Zentren beschrieben, laut denen das Durchschnittsalter der Erstmanifestation mit *A. f.* 12,9 Jahre betrug, mit einer Streuung von 5-22 Jahren. (57) Ein ähnliches Alter konnten wir mit unseren Daten bestätigen. (Vgl. Abb. 4)

Die *A. f.* Kolonisation folgte bei uns, wie schon in anderen Studien beschrieben wurde, zeitlich nach der bakteriellen Besiedlung von *P. a.* und *S. a.* (58, 59) Außerdem korrelierte in unseren Analysen eine *P. a.* Kolonisation positiv mit der

Besiedlung von *A. f.* und lieferte einen tendenziellen positiven Zusammenhang mit *C. a.*, was weitere Studien bestätigten. (16, 26, 54)

Interessanterweise sah man bei *C. a.* und *A. f.* negative Korrelationen zu *H. i.* Dieser Zusammenhang ließ sich dadurch begründen, dass in unseren Ergebnissen *H. i.* der einzige Keim war, der im höheren Alter seltener nachgewiesen wurde. Diese Tatsache stellten Valenza und Navarro in ihren Studien auch fest. (15, 60)

4.3 Lungenfunktion

Es war zu erwarten, dass sich mit höherem Alter die Lungenfunktion der CF-Patienten im Gesamtquerschnitt verschlechtert, da die abnehmende Lungenfunktion bis hin zu einer respiratorischen Insuffizienz den größten lebensverkürzenden Faktor der Betroffenen darstellt. (7, 60) Die MEF_{25} wird bei Menschen mit Mukoviszidose im Vergleich zur FEV1 seltener untersucht und dokumentiert. In einer Studie von 2003 stellte Gustafsson fest, dass bei CF-Patienten die mittlere MEF_{25} mit 64,5 % deutlich unter den Mittelwerten der FEV1 mit 89,1 % lagen, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt. (61)

Bei der Diskussion der Lungenfunktionsergebnisse sollte beachtet werden, dass die erhobenen Daten sehr von der Mitarbeit der Kinder und von der Messgenauigkeit des Personals abhängen. Sobald ein Patient von einem viralen Infekt betroffen ist, fällt der über die Spirometrie ermittelte Lungenfunktionsstatus schlechter aus als er ohne den derzeitigen Infekt zu erwarten wäre. Diese Ausreißer beeinflussten jedoch aufgrund des Querschnittsdesigns und der hohen Anzahl an Messungen das Gesamtergebnis nur minimal.

Anhand unserer Daten konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen höherem Kolonisationsstatus von jeweils *A. f.*, *A. n-f.* und *C. a.* und einem FEV1-Abfall nachweisen. Außerdem stand der *P. a.* und *H. i.* Nachweis mit einer schlechteren Lungenfunktion in Beziehung. Hinsichtlich der Frage, ob die Pilze als eigenständige Ursache für die Verschlechterung der Respiration

identifiziert werden können, liefern verschiedene Studien unterschiedlichste Ansätze und Antworten.

C. a. wurde bisher sehr häufig als apathogener oder nicht entzündungsauslösender Pilz beschrieben, der in der Allgemeinbevölkerung sehr verbreitet auf Haut, Mukosa und damit auch im Pharynx vorkommt. (62, 63) Navarro erkannte in seiner Studie einen Zusammenhang zwischen dem Pilznachweis und einer leicht verschlechterten Lungenfunktion von 5-10 % in allen Altersgruppen. Auf die möglichen Ursachen wurde jedoch nicht weiter eingegangen. (60)

Chotirmall zeigte im Jahr 2010 als Erster einen eigenständigen Zusammenhang zwischen der *C. a.* Kolonisation und einem FEV1-Abfall sowie einer im Krankenhaus behandlungsbedürftigen Verschlechterung der Krankheit. In seiner multivariablen Regressionsanalyse identifizierte er eine Pankreasinsuffizienz, Osteopenie und eine Co-Kolonisation mit *P. a.* als voraussagende Faktoren für eine *C. a.* Kolonisation. (26) Demgegenüber berichteten Máiz et al in ihrer Studie, dass eine nachgewiesene *C. a.* Besiedlung keinen Risikofaktor für eine respiratorische Verschlechterung darstellte. (27)

Reihill untersuchte 2011 den Einfluss von *C. a.* und *A. f.* auf die Immunantwort bronchialer Epithelzellen von CF-Patienten verglichen mit denen von Gesunden. Er erkannte einen modulierenden proinflammatorischen Einfluss, ausgelöst durch *A. f.*, der sich in Form gesteigerter IL-6- und IL-8 Ausschüttungen zeigte. Durch *C. a.* konnte jedoch keine veränderte Zytokinbildung nachgewiesen werden. (62)

Das pathogene Potential von *A. f.* wurde, verglichen mit *C. a.*, insgesamt ausführlicher erforscht. Bezüglich der Pathogenität von *A. f.* muss klar zwischen einem einfachen Nachweis und einer Sensibilisierung in Form von Antikörperbildung gegen den Schimmelpilz unterschieden werden.

Einen positiven Zusammenhang zwischen einer *A. f.* Kolonisation und einer Atemwegsverschlechterung der CF-Patienten erkannten neben uns, de Vrankrijker et al und viele andere. Dass ein *A. f.* Nachweis als eigenständige

Ursache eines Lungenfunktionsabfalls gesehen werden kann, konnte jedoch in den meisten Studien nicht festgestellt werden. (27, 60, 64, 65)

1997 wurde durch longitudinale Regressionsanalysen gezeigt, dass eine Sensibilisierung gegen *A. f.* mit erhöhten gesamt IgE Werten im Serum, verglichen mit nicht erhöhtem IgE und nicht-sensibilisierten Patienten, einen negativen Effekt auf die Lungenfunktion besaß. (66) Máiz et al konnten dies mit ihren Regressionsanalysen bei auf *A. f.* sensibilisierten Patienten jedoch nicht bestätigen. (38) In einer Studie in Toronto wurde wiederum bei Kindern mit CF eine *A. f.* Persistenz, die durch mindestens zwei positive Nachweise innerhalb eines Jahr definiert worden ist, als unabhängiger Risikofaktor für niedrigere FEV1%-Werte und eine Krankenhauseinweisung erkannt. (39)

4.4 BMI

Der durchschnittliche BMI aller Patienten, der in der 35. Perzentile mit einer SA von 23,9 lag, zeigte, dass 65 % der Gesamtbevölkerung im Durchschnitt einen höheren gemittelten BMI als unser Patientenkollektiv besaßen. Im Querschnitt wiesen die Tübinger Patienten einen BMI von 17,2 kg/m² auf und würden damit unter Erwachsenen als untergewichtig gelten. Bei Kindern liegen dagegen abhängig von Geschlecht und Alter niedrigere Referenzwerte in den Perzentilen-Tabellen vor. (43) Laut den bestehenden Empfehlungen für CF-Patienten von 2008 sollte der BMI der Kinder und Jugendlichen über der 50. Perzentile liegen. Analog dazu beträgt der empfohlene BMI für weibliche Erwachsene ca. 22 kg/m² und für Männliche über 23 kg/m². (67) Da unsere BMI Werte nur Querschnittergebnisse sind, wäre eine genauere Unterteilung in Kinder und Erwachsene sinnvoll gewesen, um spezifischere Aussagen bezüglich der Notwendigkeit der Gewichtssteigerung treffen zu können.

Mit Abb. 10b konnte gezeigt werden, dass das prozentuale Gewicht mit höherem Alter abnahm. Die Tatsache, dass CF-Patienten ein hohes Risiko für Untergewicht haben, kann multifaktoriell begründet werden. Das Untergewicht ist auf ein Ungleichgewicht von Kalorienzufuhr und -verbrauch zurückzuführen, was von Pencharz et al beschreiben wurde. Dabei spielen eine Malabsorption durch Pankreasinsuffizienz, ein nicht adäquat therapierter CFRD, eine

Leberzirrhose, ein gastroösophagealer Reflux, eine Anorexie und eine fallende FEV1 eine große Rolle. (68) Des Weiteren wurde ein Zusammenhang für Mangelernährung und Homozygotie für $\Delta F508$ -Mutation erwähnt, welchen wir mit unseren Analysen jedoch nicht bestätigen konnten. (69) Unterernährung, die im Querschnitt bei 14 % unserer Patienten vorlag, wurde häufig als Warnsignal einer drohenden Krankheitsverschlechterung angesehen und zöge eine sofortige therapeutische Intervention nach sich. (70)

Abb. 11 zeigt, dass bei fortgeschrittenem Lungenfunktionsabfall der BMI bezogen auf die Norm niedriger ausfällt. Auch van den Branden et al und andere stufen einen reduzierten BMI als Risikofaktor für eine Lungenfunktionsverschlechterung ein. (60, 71) Bezüglich des Kolonisationsnachweises von *A. f.* und *A. n-f.* ließ sich eine negative Korrelation zum BMI aufzeigen. Dies bestätigten de Vrankrijker et al, laut deren Ergebnissen mit *A. f.* kolonisierte Patienten verglichen mit Nicht-Betroffenen einen niedrigen BMI aufwiesen. Zu beachten war jedoch hierbei, dass die Kolonisation nicht als eigenständige Ursache für einen niedrigen BMI anzusehen war. (65) Demgegenüber erbrachten die Studien um Amin et al keine Unterschiede bezüglich der BMI Werte zwischen *A. f.* besiedelten und unbesiedelten CF-Patienten. (39) Zwischen dem Nachweis von *C. a.*, *C. n-a.* und dem BMI konnten wir keinen Zusammenhang herstellen. Damit konnten wir Chotirmalls Studie nicht bekräftigen, in welcher Patienten mit einem *C. a.* Nachweis verglichen mit Patienten, die nicht mit diesem kolonisiert waren, einen signifikant größeren BMI-Abfall hatten. (26)

4.5 Allergologie

Mit unseren Daten konnte gezeigt werden, dass das Gesamt IgE im Serum der Patienten mit dem Alter ansteigt, was unter anderem schon el-Dahr beschrieben hatte. (72) Die fungalen Kolonisationen betrachtend, konnte nur ein signifikanter Zusammenhang zwischen Gesamt IgE im Serum und *A. n-f.*, nicht jedoch zwischen Gesamt IgE und *A. f.* nachgewiesen werden.

Die Sensibilisierung in Form eines spezifisch auf *A. f.* gebildeten IgE Antikörpers konnte bei knapp 40 % der Tübinger Patienten im Serum

nachgewiesen werden. Vergleichswerte hierzu reichen von 22 % im Jahr 1979 beschrieben (35), über 20 % im Jahre 1994 (72) bis 64,5 % im Jahre 2002 (38). Interessanterweise korrelierten bei unseren Daten die *A. f.* Kolonisationsgruppen in der Gesamtheit nicht mit den gegen ihn gerichteten Antikörpern, was auch Máiz und el-Dahr festgestellt haben. (38, 72)

Außerdem wurde die Frage aufgeworfen, warum bei der Gruppe, die keinen positiven *A. f.* Nachweis zeigte, teilweise eine hohe IgE Antikörperproduktion spezifisch gegen *A. f.* vorlag. Diese Diskrepanz wurde zum einen von Máiz dadurch begründet, dass die Sputumanalysen für *Aspergillus* nicht den wahren Kolonisationsstatus in der Lunge widerspiegeln würden. (38) Zum anderen stellten Fillaux et al in ihrer Studie fest, dass auf positive *A. f.* IgE Antikörper im Serum häufig noch eine *A. f.* Bestätigung im Sputum folgen würde. (73)

Zu kritisieren ist an unserem Studiendesign, dass nur rückblickend Zusammenhänge aus Querschnittsanalysen festgestellt werden konnten. Aussagekräftiger wäre es gewesen, die Antikörperbildung vor und nach erster nachgewiesener *Aspergillus* Kolonisation zu bestimmen. Diese hätten miteinander in Beziehung gesetzt werden und im Krankheitsverlauf verglichen werden können.

4.6 ABPA

Trotz der spezifischen ABPA-Diagnosekriterien, die 2003 von der Cystic Fibrosis Foundation etabliert wurden, blieb die definitive Diagnosestellung einer ABPA bei CF-Patienten eine Herausforderung. (74, 75) Die Th2-Zell-vermittelte allergische bronchopulmonale Aspergillose trat in der Tübinger Studie bei nur 3,9 % der Patienten auf. Die Häufigkeit der Diagnose lag im Vergleich zu einer Studie, welche über Prävalenzen von 2-25 % berichtete, im unteren Bereich, obwohl der Schimmelpilz *A. f.* bei über 50 % unserer Patienten mindestens einmal nachgewiesen wurde. (73) Dass die Krankheit in unserer Patientenkohorte selten bestätigt wurde, kann eventuell dadurch begründet werden, dass hauptsächlich jüngere Patienten einbezogen worden sind. Höhere Prävalenzen einer ABPA könnten in der Stuttgarter Erwachsenenambulanz dokumentiert sein.

Mastella et al berichteten in einer großen Studie mit über 12.000 eingeschlossenen CF-Patienten aus Europa, dass die Diagnose ABPA bei Kindern unter sechs Jahren selten gestellt wurde, aber mit höherem Alter relativ konstant bei 10 % lag. (36) Bei unseren CF-Patienten erfolgte nur bei vier der fünf Diagnostizierten ein positiver *A. f.* Nachweis im Respirationstrakt, was die Diagnose ABPA jedoch nicht ausschließt. (38)

Um Vergleiche mit weiteren Studien ziehen zu können, wäre ein größeres ABPA-Patientenkollektiv wünschenswert. Außerdem wäre eine Erweiterung mit nachfolgenden Informationen notwendig, um eine exakte Aussage über die Problematik der Diagnosestellung einer ABPA treffen zu können. Der zurückliegende Krankheitsverlauf, Diagnosezeitpunkt und Röntgen- oder CT-Thoraxbildgebungen wären hier von Interesse gewesen. Aus allergologischer Sicht hätte man eine spezifisch auf *A. f.* entwickelte Hautreaktion, eine Bestimmung spezifischer *A. f.* IgG Werte sowie einen Nachweis rekombinanter *A. f.* Allergenen im Serum mit in die Analyse einbeziehen können. (33)

Neben den IgE Serumwerten stellen weitere Biomarker Forschungsschwerpunkte bezüglich der Risikoeinschätzung und exakten Diagnosestellung einer ABPA dar. Zu nennen sind hier CCL 17, TARC und die Untersuchung auf rekombinante *A. f.* Allergene (rAsp f) 1, 3, 4 und 6. (34, 75, 76)

4.7 Medikamentöse Therapie

Bisher ist wenig über die Auswirkung von Triazolen auf Pilze bei Patienten mit Mukoviszidose bekannt. (54) Unsere Analysen ergaben, dass insgesamt nur 14 Patienten über den gesamten Studienverlauf mit Antimykotika therapiert wurden und es ausschließlich bei der Diagnose ABPA und *A. n-f.* eine positive Korrelation zur antifungalen Therapie gab.

Zu beachten ist bei der antimykotischen Therapie die Variabilität der Pharmakokinetik, die zu unterschiedlichen Azol-Serumspiegeln führen kann. (77) Eine Studie aus Canada zeigte, dass trotz der Itraconazol Therapie nach der ABPA-Leitlinie nur 57 % der behandelten *Aspergillus* positiven Patienten die für eine erfolgreiche Eradikation nötigen Plasmaspiegel erreichten. Aus diesem

Grund ist die Spiegelbestimmung des Medikaments empfehlenswert. (78) Außerdem haben sich laut Bueid et al schon viele Resistenzen von *A. f.* gegen Triazole in Europa, China, Canada und den USA entwickelt. (79) Burgel et al entdeckten einen Zusammenhang zwischen den Resistenzen von *Aspergillus* gegen Itraconazol bei erwachsenen Patienten mit Mukoviszidose. Sie schlugen deshalb weitere systematische *A. f. in vitro* Untersuchung bezüglich einer Azol-Empfindlichkeit speziell gegenüber Itraconazol vor. (80)

Resistenzen von *C. a.* gegenüber Antimykotika wurden bisher selten entdeckt. Muthig et al berichteten, dass die Mehrheit der *Candida* Isolate empfindlich gegenüber allen getesteten antifungalen Medikamenten war. (81) Eine norwegische Studie bestätigte diese Feststellung bei der Analyse von CF-Patienten über eine Zeitspanne von zehn Jahren. Zu bemängeln war hier jedoch die kleine Stichprobe von 37 Betroffenen. (82)

Bezüglich der weiteren pharmakologischen Therapie kam in unserer Studie das Problem auf, dass der Einsatz einiger Medikamente unvollständig im Hinblick auf die Dosierung und den Behandlungszeitraum dokumentiert war. Aufgrund häufiger und akuter Infekte des Respirationstrakts wurden z. B. orale Antibiotika in telefonischer Absprache zwischen Eltern und behandelnden Ärzten gegeben und somit mehrfach nicht im MUKO.DOK dokumentiert.

Statistische Analysen lieferten eine positive Assoziation zwischen der inhalativen Antibiotikatherapie sowohl zu *C. a.* als auch zu *A. f.* Burns et al bestätigten diesen Zusammenhang. In ihrer Studie wurden in einer mit Tobramycin behandelten Gruppe verglichen mit einer Placebogruppe mehr Kulturen von *A. f.* und *C. a.* isoliert. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die absolute Zahl der nachgewiesenen Pilze nach 20 wöchiger Inhalationstherapie in beiden Gruppen niedriger war und additive antifungale Therapien im Studiendesign nicht ausgeschlossen waren. (83)

Bei dem Auftreten einer ABPA ist neben der Itraconazol Therapie eine zusätzliche Steroideinnahme indiziert, was insbesondere bei Jugendlichen zur Entwicklung eines Diabetes mellitus führen kann. (9) Auch bei uns konnte eine tendenzielle Korrelation zwischen einem sich entwickelnden CFRD und einer Corticosteroid Therapie gezeigt werden.

4.8 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnten wir aus unseren Ergebnissen schließen, dass ein positiver Pilznachweis bei an Mukoviszidose erkrankten Kindern mit einer erhöhten Morbidität assoziiert ist. Wir konnten außerdem zeigen, dass ein chronischer fungaler Kolonisationsstatus mit einer stärkeren Lungenfunktionsbeeinträchtigung einherging.

Des Weiteren bestätigten wir, dass mit steigendem Alter häufiger fungale und bakterielle Kolonisationen der Atemwege bei Patienten mit CF auftraten. Ausgenommen hiervon war das Bakterium *H. i.*, welches mit steigendem Alter seltener nachgewiesen wurde und deshalb negativ mit steigendem Kolonisationsnachweis von *A. f.* und *C. a.* korrelierte. Der hohe Nachweis fungaler Kolonisationen ließ sich insgesamt durch den früheren und häufigeren Antibiotikaeinsatz, durch die Zunahme oraler Glukokortikoid Therapien sowie die insgesamt steigende Lebenserwartung der Patienten begründen. (16, 49, 59)

Der Vergleich von Pilzprävalenzen in Sputumproben oder Pharyngealabstrichen wurde durch differentielle Nachweismethoden, unterschiedliche Populationen und geographische Verteilungsunterschiede erschwert. Notwendig sind standardisierte Identifikationsmethoden für exakte qualitative und quantitative Nachweise der Pilze. Dies würde weitere Möglichkeiten in der Forschung mikrobiologischer Interaktionen erbringen, Therapieentscheidungen optimieren und Vergleiche zwischen den einzelnen CF-Zentren erleichtern. (50, 53)

Wünschenswert sind außerdem weitere Studien bezüglich der Erstmanifestation von Pilzen bei CF-Patienten, um bessere Vergleiche ziehen und Kinder bei nachgewiesener Besiedlung von potentiell pathogenen Keimen frühzeitig therapieren zu können. Des Weiteren fehlen noch Serum- oder Sputummarker, die sicher zwischen einer Kolonisation und einer Infektion von Pilzen unterscheiden können. (84)

Eine positive Assoziation zwischen einer BMI-Verringerung und einer chronischen fungalen Kolonisation konnte nur bei *Aspergillus* positiv-getesteten Patienten, nicht jedoch bei *Candida*-Positiven aufgezeigt werden. 14 % der an Mukoviszidose Erkrankten galten mit dem für sie errechneten und gemittelten

BMI verglichen mit der Norm als untergewichtig. Bei diesen Patienten sollte eine erhöhte Kalorienzufuhr angedacht werden, da ein niedriger BMI eine drohende Krankheitsverschlechterung mit sich bringen kann. (70) Ob jedoch *A. f.* ein Teil der Ursache für das niedrigere Gewicht oder ein zufälliges Ereignis war, lässt sich mit unserem Studiendesign nicht festlegen.

Obwohl bei über 50 % unserer CF-Patienten *A. f.* nachgewiesen werden konnte, zeigten nur knapp 40 % aller Patienten erhöhte spezifisch gegen *A. f.* gerichtete IgE Antikörper und nur 3,9 % der Patienten erkrankten an einer ABPA. Dieses Ergebnis konnte zu der Annahme führen, dass die pulmonale Hyperreagibilität erst mit höherem Alter entsteht und unser Patientenkollektiv noch zu jung für die Entwicklung einer ABPA war.

Um insgesamt ein relevanteres Ergebnis aus einer fungalen Kolonisation und der dadurch ausgelösten Veränderung der Lungenfunktion zu erreichen, müssten wir ein longitudinales Studiendesign ähnlich Chotirmall wählen. (26) Dadurch könnte man einzelne Störvariablen ausschließen und die fungalen Kolonisationen als unabhängige Faktoren analysieren.

Middletons Vorschlag der Unterdrückung oder Eradizierung der Pilze mit fungiziden Medikamenten wäre eine weitere Möglichkeit die Pathogenität der Pilze näher zu erforschen. (45) Jedoch wurden bis dato zu wenig an Mukoviszidose erkrankte Patienten konsequent nach standardisierten Protokollen mit Antimykotika behandelt, um signifikante Ergebnisse erreichen zu können.

Zuletzt bleibt das Henne-Ei-Problem unbeantwortet. Zum einen war bei den beschriebenen Studien die Pilzbesiedelung eine Ursache für eine schlechtere Lungenfunktion. Zum anderen schuf die fortgeschrittene Lungendestruktion in Form von Fibrose und Entzündung bzw. die erfolgte antibakterielle Therapie ein besseres Milieu und somit einen Kolonisationsvorteil für den Pilz. (39)

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die Tübinger CF-Patienten in Bezug auf fungale Kolonisationen, speziell *C. a.* und *A. f.*, zu untersuchen und den Einfluss dieser Pilze auf klinische Parameter einzuschätzen.

Durch die Analyse von 128 an Mukoviszidose erkrankten Kindern über einen Zeitraum von zehn Jahren, konnten wir eine umfangreiche Datentabelle für unsere Analysen erstellen. Zu den eingeschlossenen klinischen Parametern gehörten neben der Mikrobiologie, die Lungenfunktion, der BMI, allergologische Testwerte sowie die medikamentöse Therapie der Patienten.

Unsere Patientenkohorte umfasste 65 männliche und 63 weibliche Betroffene mit einem Durchschnittsalter von 14,5 Jahren. Aus den über 4000 einbezogenen Mikrobiologiebefunden war ersichtlich, dass *C. a.* mit 86,7 % der häufigste im Sputum- oder Pharyngealsekret nachgewiesene Pilz bei Patienten mit Mukoviszidose war, gefolgt von *Candida* Spezies, welche verglichen mit *C. a.* sehr viel seltener chronische Kolonisations-Verläufe zeigten. Der bei CF am häufigsten untersuchte *A. f.* wurde bei 53,9 % mindestens einmal mikrobiologisch nachgewiesen und nur 9,4 % der Patienten waren chronisch mit diesem kolonisiert. Weitere *Aspergillus* Spezies manifestierten sich nur bei ca. 15 % aller eingeschlossenen Patienten.

Die Erstmanifestation von *C. a.* lag bei einem Durchschnittsalter von 2,12 Jahren und von *C. n-a.* bei 2,71 Jahren. Dagegen trat *A. f.* durchschnittlich erst mit einem Alter von 13,07 und *A. n-f.* mit 16,13 Jahren auf.

Zusammenfassend korrelierten die Kolonisationsstatus von *C. a.* und *A. f.* jeweils positiv miteinander, mit dem Alter und einer inhalativen Antibiotikatherapie sowie mit *P. a.* Beide Pilze korrelierten negativ mit *H. i.* Der Kolonisationsstatus von *A. f.* zeigte außerdem jeweils einen positiven Zusammenhang zum Vorkommen von *S. m.* und CFRD.

Bezüglich der Lungenfunktion, die als wichtigster prädiktiver Marker für die Lebenserwartung der CF-Patienten gilt, konnten bei höherem Kolonisationsstatus von *C. a.*, *A. f.* und *A. n-f.* signifikant schlechtere spirometrisch ermittelte FEV1%- und MEF₂₅%-Werte nachgewiesen werden.

Die Gesamtmittelwerte der FEV1 und der MEF₂₅ aller CF-Patienten lagen bei 89 % und 57 % im Bezug zur Norm der Gesamtbevölkerung.

Der gemittelte BMI aller Patienten lag in der 35. Perzentile und rund 14 % der Erkrankten waren untergewichtig. Ein Zusammenhang zwischen der Pilzkolonisation und einem niedrigerem Körpergewicht konnte nur für *Aspergillus*, nicht aber für *Candida* gezeigt werden.

Zu diesem Zeitpunkt bleibt unbeantwortet, ob die fungale Kolonisation als Ursache der Lungenfunktionsverschlechterung angesehen werden kann oder ob die Pilze aufgrund der chronischen pulmonalen Entzündung vermehrt im Sputum- oder Pharyngealsekret nachgewiesen wurden. Hierzu wäre ein longitudinales Studiendesign wünschenswert, welches den Zusammenhang zwischen Pilzkolonisation und standardisierten Lungenfunktionsparametern unter Ausschluss von Störvariablen im zeitlichen Verlauf zeigen würde.

Um die Vergleichbarkeit der Kolonisationen insgesamt zu verbessern und objektiverbarere Aussagen über die Pathogenität der Pilze erreichen zu können, sollten global standardisierte Nachweismethoden für die einzelnen fungalen Spezies etabliert werden. Zusammenfassend unterstreicht diese Studie die zunehmende Wichtigkeit fungaler Kolonisation bei Patienten mit Mukoviszidose.

6. Literaturverzeichnis

1. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*. 1992;256(5058):774-9.
2. B. Sens MS. *Berichtsband- Qualitätssicherung Mukoviszidose 2011*. Hippocampus Verlag; 2012.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-73.
4. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*. 1991;253(5016):202-5.
5. Di Sant'Agnes PA, Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas in young adults. *Ann Intern Med*. 1959;50(5):1321-30.
6. Quattrucci S, Rolla M, Cimino G, Bertasi S, Cingolani S, Scalercio F, et al. Lung transplantation for cystic fibrosis: 6-year follow-up. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2005;4(2):107-14.
7. Hirche TO, Wagner TOF. Update Mukoviszidose. In: Thieme, editor. *Physiotherapie, Inhalation, Mukolyse*. 32010.
8. Hirche TO, Wagner TOF. Update Mukoviszidose. In: Thieme, editor. *Psychische, soziale und rechtliche Fragen & der schwerkranken und sterbenden Patient*. 42011.
9. Ballmann DM, Smaczny DC. *CF-Manual*. Bremen: UNI- MED; 2008.
10. Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2005;4(1):7-26.
11. Chotirmall SH, McElvaney NG. Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;52:161-73.
12. Hof H, Dörries R. *Medizinische Mikrobiologie*: Thieme; 2009.
13. Hahn K, Schulz, Suerbaum. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: Springer; 2009.
14. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in microbiology*. 2011;19(5):241-7.
15. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2008;7(2):123-7.
16. Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nubling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*. 2003;46(1-2):19-23.
17. Chotirmall SH, Greene CM, McElvaney NG. *Candida* species in cystic fibrosis: A road less travelled. *Medical mycology*. 2010;48 Suppl 1:S114-24.
18. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN microbiology*. 2012;2012:538694.
19. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*. 2004;12(7):317-24.
20. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(3):400-28, table of contents.

21. Horn DL, Ostrosky-Zeichner L, Morris MI, Ullmann AJ, Wu C, Buell DN, et al. Factors related to survival and treatment success in invasive candidiasis or candidemia: a pooled analysis of two large, prospective, micafungin trials. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2010;29(2):223-9.
22. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection and immunity*. 1994;62(3):915-21.
23. Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista iberoamericana de micologia*. 2002;19(3):139-43.
24. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*. 2001;183(18):5385-94.
25. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Current opinion in microbiology*. 2002;5(6):608-11.
26. Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest*. 2010;138(5):1186-95.
27. Maiz L, Cuevas M, Lamas A, Sousa A, Quirce S, Suarez L. [*Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in cystic fibrosis: clinical significance and specific immune response involving serum immunoglobulins G, A, and M]. *Arch Bronconeumol*. 2008;44(3):146-51.
28. Kanthan SK, Bush A, Kemp M, Buchdahl R. Factors effecting impact of *Aspergillus fumigatus* sensitization in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 2007;42(9):785-93.
29. Speirs JJ, van der Ent CK, Beekman JM. Effects of *Aspergillus fumigatus* colonization on lung function in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2012;18(6):632-8.
30. Massam J, Bitnun A, Solomon M, Somers GR, Guerguerian AM, van Wylick R, et al. Invasive aspergillosis in cystic fibrosis: a fatal case in an adolescent and review of the literature. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(2):178-80.
31. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, et al. *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(6):2243-51.
32. Hartl D, Latzin P, Zissel G, Krane M, Krauss-Etschmann S, Griese M. Chemokines indicate allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(12):1370-6.
33. Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;110(5):685-92.
34. Eickmeier O, Rieber N, Eckrich J, Hector A, Graeppler-Mainka U, Hartl D. Immune response, diagnosis and treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis lung disease. *Curr Pharm Des*. 2013;19(20):3669-78.
35. Nelson LA, Callerame ML, Schwartz RH. Aspergillosis and atopy in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1979;120(4):863-73.
36. Mastella G, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Navarro J, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. *Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. The European respiratory journal*. 2000;16(3):464-71.
37. Gungor O, Tamay Z, Guler N, Erturan Z. Frequency of fungi in respiratory samples from Turkish cystic fibrosis patients. *Mycoses*. 2013;56(2):123-9.
38. Maiz L, Cuevas M, Quirce S, Canon JF, Pacheco A, Sousa A, et al. Serologic IgE immune responses against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2002;121(3):782-8.

39. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2010;137(1):171-6.
40. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2003;2(1):29-34.
41. Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H. Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *The New England journal of medicine*. 1992;326(18):1187-91.
42. Schluchter MD, Konstan MW, Drumm ML, Yankaskas JR, Knowles MR. Classifying severity of cystic fibrosis lung disease using longitudinal pulmonary function data. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(7):780-6.
43. K. Kromeyer-Hauschild MW, D. Kunze, F. Geller, H.C. Geiß, V. Hesse, A. von, Hippel UJ, D. Johnsen, W. Korte, K. Menner, G. Müller, J.M. Müller, A. Niemann-, Pilatus TR, F. Schaefer, H.-U. Wittchen, S. Zabransky, K. Zellner, A. Ziegler, J., Hebebrand. Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. Springer Verlag. 2001;149(8).
44. Heijerman H, Westerman E, Conway S, Touw D, Doring G, consensus working g. Inhaled medication and inhalation devices for lung disease in patients with cystic fibrosis: A European consensus. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2009;8(5):295-315.
45. Middleton PG, Chen SC, Meyer W. Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2013;19(6):670-5.
46. Bauernfeind A, Bertele RM, Harms K, Horl G, Jungwirth R, Petermuller C, et al. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection*. 1987;15(4):270-7.
47. Hoppe JE, Theurer-Mainka U, Stern M. Comparison of three methods for culturing throat swabs from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(7):1896-8.
48. Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Medical mycology*. 2014;52(2):179-86.
49. Sudfeld CR, Dasenbrook EC, Merz WG, Carroll KC, Boyle MP. Prevalence and risk factors for recovery of filamentous fungi in individuals with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2010;9(2):110-6.
50. Nagano Y, Millar BC, Goldsmith CE, Walker JM, Elborn JS, Rendall J, et al. Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis (CF). *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2008;7(6):566-72.
51. Peltroche-Llacsahuanga H, Dohmen H, Haase G. Recovery of *Candida dubliniensis* from sputum of cystic fibrosis patients. *Mycoses*. 2002;45(1-2):15-8.
52. Simmonds EJ, Littlewood JM, Hopwood V, Evans EG. *Aspergillus fumigatus* colonisation and population density of place of residence in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood*. 1994;70(2):139-40.
53. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrere J, Favennec L, Ranque S, et al. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Medical mycology*. 2010;48 Suppl 1:S88-97.
54. Delhaes L, Monchy S, Frealle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PloS one*. 2012;7(4):e36313.

55. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Olinsky A, Phelan PD. Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 1996;21(5):267-75.
56. Jain K, Wainwright C, Smyth AR. Bronchoscopy-guided antimicrobial therapy for cystic fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;12:CD009530.
57. Cimon B, Carrere J, Vinatier JF, Chazalotte JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2000;19(1):53-6.
58. Kraemer R, Delosea N, Ballinari P, Gallati S, Cramer R. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on lung function in children with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(11):1211-20.
59. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Medical mycology*. 2009;47(4):387-97.
60. Navarro J, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Mastella G, et al. Factors associated with poor pulmonary function: cross-sectional analysis of data from the ERCF. *European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. The European respiratory journal*. 2001;18(2):298-305.
61. Gustafsson PM, Aurora P, Lindblad A. Evaluation of ventilation maldistribution as an early indicator of lung disease in children with cystic fibrosis. *The European respiratory journal*. 2003;22(6):972-9.
62. Reihill JA, Moore JE, Elborn JS, Ennis M. Effect of *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* on pro-inflammatory response in cystic fibrosis epithelium. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2011;10(6):401-6.
63. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(2):112-22.
64. Milla CE, Wielinski CL, Regelman WE. Clinical significance of the recovery of *Aspergillus* species from the respiratory secretions of cystic fibrosis patients. *Pediatric pulmonology*. 1996;21(1):6-10.
65. de Vrankrijker AM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJ, Bonten MJ, et al. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(9):1381-6.
66. Wojnarowski C, Eichler I, Gartner C, Gotz M, Renner S, Koller DY, et al. Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and lung function in children with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(6):1902-7.
67. Culhane S, George C, Pearo B, Spoede E. Malnutrition in cystic fibrosis: a review. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 2013;28(6):676-83.
68. Pencharz PB, Durie PR. Pathogenesis of malnutrition in cystic fibrosis, and its treatment. *Clinical nutrition*. 2000;19(6):387-94.
69. Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J, Wolfe S, Steinkamp G, Heijerman HG, et al. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2002;1(2):51-75.
70. Panagopoulou P, Maria F, Nikolaou A, Nousia-Arvanitakis S. Prevalence of Malnutrition and Obesity Among Cystic Fibrosis Patients. *Pediatr Int*. 2013.
71. Vandenbranden SL, McMullen A, Schechter MS, Pasta DJ, Michaelis RL, Konstan MW, et al. Lung function decline from adolescence to young adulthood in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 2012;47(2):135-43.

72. el-Dahr JM, Fink R, Selden R, Arruda LK, Platts-Mills TA, Heymann PW. Development of immune responses to *Aspergillus* at an early age in children with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;150(6 Pt 1):1513-8.
73. Fillaux J, Bremont F, Murriss M, Cassaing S, Tetu L, Segonds C, et al. *Aspergillus* Sensitization or Carriage in Cystic Fibrosis Patients. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013.
74. Delhaes L, Frealle E, Pinel C. Serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: State of the art and further challenges. *Medical mycology*. 2010;48 Suppl 1:S77-87.
75. Hartl D. Immunological mechanisms behind the cystic fibrosis-ABPA link. *Medical mycology*. 2009;47 Suppl 1:S183-91.
76. Latzin P, Hartl D, Regamey N, Frey U, Schoeni MH, Casaulta C. Comparison of serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *The European respiratory journal*. 2008;31(1):36-42.
77. Conway SP, Etherington C, Peckham DG, Brownlee KG, Whitehead A, Cunliffe H. Pharmacokinetics and safety of itraconazole in patients with cystic fibrosis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;53(5):841-7.
78. Aaron SD, Vandemheen KL, Freitag A, Pedder L, Cameron W, Lavoie A, et al. Treatment of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a randomized, placebo-controlled pilot study. *PloS one*. 2012;7(4):e36077.
79. Bueid A, Howard SJ, Moore CB, Richardson MD, Harrison E, Bowyer P, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(10):2116-8.
80. Burgel PR, Baixench MT, Amsellem M, Audureau E, Chapron J, Kanaan R, et al. High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(2):869-74.
81. Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Muller FM. Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Medical mycology*. 2010;48(1):56-63.
82. Gammelsrud KW, Sandven P, Hoiby EA, Sandvik L, Brandtzaeg P, Gaustad P. Colonization by *Candida* in children with cancer, children with cystic fibrosis, and healthy controls. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):1875-81.
83. Burns JL, Van Dalen JM, Shawar RM, Otto KL, Garber RL, Quan JM, et al. Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(5):1190-6.
84. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;132(3):560-6 e10.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Tübingen, Abteilung Hämatologie / Onkologie / Allg. Pädiatrie unter der Betreuung von Prof. Dr. Dominik Hartl durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dominik Hartl, Dr. Andreas Hector und Dr. Ute Graepler-Mainka. Die Betreuung und Korrektur der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Hartl und Dr. Hector.

Die Daten-Recherche erfolgte durch mich mit letztlcher Unterstützung von Lisa Schwarz. Iris Bergmann erbrachte die Zusammenstellung der vorhandenen Daten aus dem Softwaremodul MUKO.DOK. Die Universitäts-Hautklinik gab mir die Möglichkeiten die nötigen allergologischen Daten bei ihnen zu erfassen. Die Bereitstellung der Lungenfunktionsergebnisse erfolgte durch Ulrike Rassow-Schlanke.

Unter Absicherung durch Prof. Dr. Hartl und Prof. Martus erfolgte die statistische Auswertung durch mich.

Ich versichere, dass ich die Dissertationsschrift „Fungale Kolonisation bei Patienten mit Mukoviszidose“ selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe.

Tübingen, den 20.01.2016

8. Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Hector A, Kirn T, Ralhan A, Graepler-Mainka U, Berenbrinker S, Riethmueller J, et al. - "Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis" - Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society. - 2016;15(3):340-9.

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dominik Hartl für die Möglichkeit die Arbeit bei ihm zu schreiben, die seinerseits allzeit schnelle Rückmeldung und natürlich für seine kompetente Unterstützung.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Andreas Hector sehr für die immer nette und gute Betreuung und dem ganzen Team für die witzigen Lab-Meetings und Partys.

Ein großer Dank gilt auch Iris Bergmann, die sich geduldig mit allen Anforderungen auseinandergesetzt hat und immer schnellstmöglich und verlässlich unsere Wünsche erfüllt hat.

Außerdem möchte ich sehr herzlich Iris Schäfer für ihre großartige Hilfe im Labor und aufopfernde Unterstützung für das ganze Team danken.

Ebenso gilt mein Dank Dr. Ute Graepler-Mainka, Ulrike Rassow-Schlanke, Lisa Schwarz, Dr. Silke Peter, Dr. Julia-Stefanie Frick, Laura Hofer, Uta Hamacher und vielen weiteren, die mich durch ihre Hilfe unterstützt haben.

Ich danke ganz besonders Benedikt Wagner, meiner Familie und meinen Freunden, die mich jederzeit neu motiviert und aufgefangen haben und mir einen starken Rückhalt entlang des gesamten Studiums gaben. Danke! :)

Anhang

Tab. 12: Einteilung des Schweregrads der Lungenerkrankung in Abhängigkeit der Lungenfunktion (FEV1%) und des Alters (modifiziert nach Schluchter et al) (42)

Alter (in Jahren)	severe	moderate	mild-moderate	mild
8	≤ 80	≤ 98	> 98-108	≥ 109
9	≤ 79			
10	≤ 78			
11	≤ 77			
12	≤ 75	≤ 94	> 94-108	≥ 109
13	≤ 72			
14	≤ 69			
15	≤ 67	≤ 88	>88	≥ 97
16	≤ 63			≥ 92
17	≤ 60			≥ 90
18	≤ 59	≤ 77	>77	≥ 87
19	≤ 57			≥ 86
20	≤ 54			≥ 84
21	≤ 50	≤ 58	> 58	≥ 82
22	≤ 45			≥ 77
23	≤ 39	≤ 50	> 50	≥ 70
24	≤ 36			≥ 68
25	≤ 34			≥ 67
26	≤ 29	≤ 38	>38	≥ 62
27				≥ 58
28				≥ 54
29				≥ 52
30	≤ 24	≤ 34	> 34	≥ 50
31				≥ 45
32				≥ 32
33				≥ 32