

Monatsschr Kinderheilkd 2013 · 161:406–416
 DOI 10.1007/s00112-012-2798-y
 Online publiziert: 28. April 2013
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Redaktion

G. Hansen, Hannover

T. Nüßlein¹ · F. Brinkmann² · P. Ahrens³ · M. Ebsen⁴ · A. Jung⁵ · W. Kirchberger⁶ · A. Kneißl⁶ · C. Koerner-Rettberg⁷ · H. Linz-Keul⁸ · N.T. Loges⁹ · D. Theegarten¹⁰ · H. Seithe¹¹ · J. Sendler⁶ · C. Werner⁹ · H. Omran⁹

- ¹ Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Koblenz und Mayen, Koblenz
- ² Klinik für pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Medizinischen Hochschule Hannover
- ³ Darmstädter Kinderklinik Prinzessin Margaret, Darmstadt
- ⁴ Institut für Pathologie, Städtisches MVZ (Medizinisches Versorgungszentrum) Kiel
- ⁵ Kinderspital Zürich, Universitäts-Kinderkliniken, Zürich
- ⁶ Selbsthilfverein Kartagener Syndrom und Primäre Ciliäre Dyskinesie e. V., Steffisburg
- ⁷ Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, St. Josef-Hospital, Ruhr-Universität Bochum
- ⁸ Praxis für Physiotherapie, Bad Kissingen
- ⁹ Allgemeine Pädiatrie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Münster
- ¹⁰ Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, Essen
- ¹¹ Klinik für Neugeborene, Kinder und Jugendliche, Klinikum Süd, Nürnberg

Diagnostik der primären ziliären Dyskinesie

Empfehlungen in Zusammenarbeit mit Kartagener-Syndrom und Primäre Ciliäre Dyskinesie e. V.

Bei der PCD handelt es sich um eine Gruppe angeborener Erkrankungen, bei welchen die Zilienmotilität gestört ist. Aufgrund der unterschiedlichen genetischen Ursachen dieser Störung, der Verschiedenartigkeit der Erkrankungsmanifestationen und der unterschiedlichen Arten des Zilien-

defekts gestaltet sich die Diagnostik schwierig. Gleichzeitig aber ist eine frühzeitige und zeitnahe Diagnosestellung wichtig, um den Betroffenen eine belastende Suche nach anderen Differenzialdiagnosen zu ersparen und eine adäquate Therapie einleiten zu können. Hierfür sind standardisierte Algorithmen hilfreich.

erarbeitete Consensus Statement zur Diagnostik und Therapie der PCD bei Kindern [3], welches unter Berücksichtigung aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse auf die aktuellen Gegebenheiten der diagnostischen Ressourcen in Deutschland angewendet wurde.

Hintergrund

Die PCD ist eine angeborene seltene Störung der Zilienmotilität. Erkrankte werden in der Mehrzahl mit Symptomen auffällig, die durch eine Sekretretention im oberen und unteren Respirationstrakt verursacht werden. In 40–50% der Fälle besteht zusätzlich ein Situs inversus (Kartagener-Syndrom). Eine frühzeitige und zeitnahe Dia-

Erstellung der Empfehlungen

Methodik und Vorgehen

Die vorgestellten Diagnostikempfehlungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Selbsthilfverein Kartagener-Syndrom und Primäre Ciliäre Dyskinesie e. V. (Infobox 1) durch eine Expertengruppe erarbeitet. Hierzu wurden die einzelnen Diagnostikbausteine diskutiert, bewertet und abschließend in einem Algorithmus (Abb. 1) zusammengeführt. Damit wurde eine Handlungsanleitung zur spezifischen PCD-Diagnostik anhand standardisierter Qualitätskriterien für den deutschen Raum entwickelt. Als Grundlagediente das 2009 von der ERS Task Force

Abkürzungsverzeichnis	
ATS	American Thoracic Society
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRC	Dyneinarmregulatorkomplex
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERS	European Respiratory Society
HVMA	Hochfrequenzvideomikroskopieanalyse
IDA	„Inner dynein arm“
IF	Immunfluoreszenz
KS	Kartagener-Syndrom
NO	Stickstoffmonoxid
ODA	„Outer dynein arm“
PCD	„Primary ciliary dyskinesia“
ppb	„Parts per billion“
RDS	„Respiratory distress syndrome“
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute medium“
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

Infobox 1

Selbsthilfverein Kartagener Syndrom und Primäre Ciliäre Dyskinesie e.V.
 www.kartagener-syndrom.org
Korrespondenzadresse
 c/o Dr. B. Rindlisbacher, Traubenweg 67
 CH-3612 Steffisburg
 vorstand@kartagener-syndrom.de

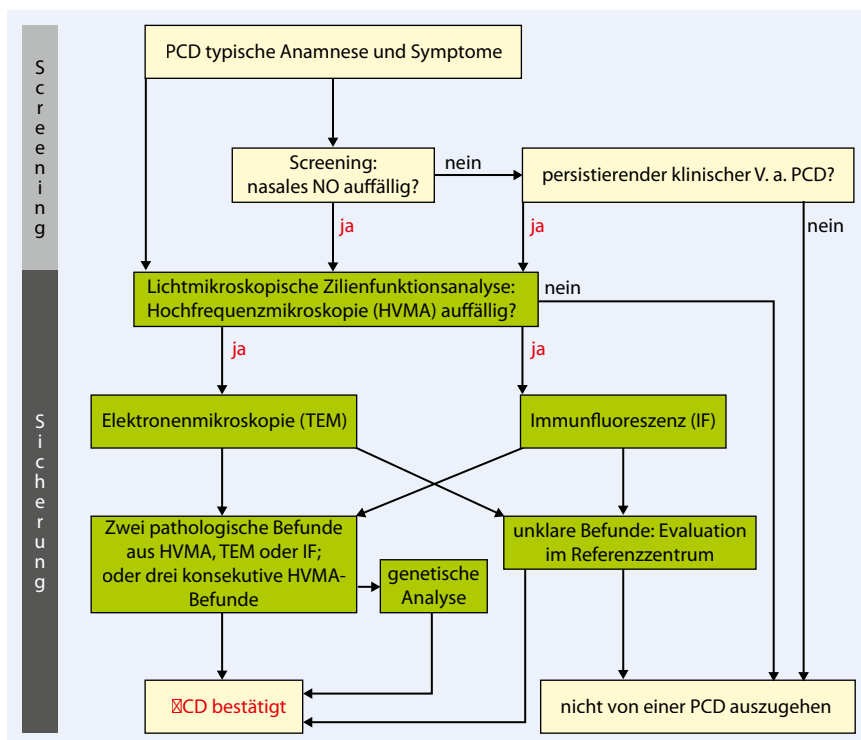


Abb. 1 ▲ Standardisierter Algorithmus zur PCD-Diagnostik, V.a. Verdacht auf, Erläuterung der weiteren Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

gnosestellung ist für die Betroffenen wichtig, um eine unnötige und belastende Suche nach anderen Differenzialdiagnosen zu vermeiden und eine fokussierte Therapie und ein Monitoring des Erkrankungsverlaufs beginnen zu können.

» Bei der PCD handelt es sich nicht um eine singuläre Erkrankung

Die PCD-Diagnostik ist komplex, da es sich nicht um eine singuläre Erkrankung mit definierter klinischer Präsentation und einheitlichem Ziliendefekt, sondern um eine Gruppe von Erkrankungen mit unterschiedlichen genetischen Ursachen und verschiedenen Erkrankungsmanifestationen, wie vielfältigen strukturellen und/oder funktionellen Zilienstörungen, handelt. Eine Anzahl von PCD-Varianten lässt sich nicht mit allen verfügbaren Methoden diagnostizieren. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung wird diese weniger häufig differenzialdiagnostisch erwogen. Darüber hinaus ist die Abgrenzung sekundärer Zilienfunktionsstörun-

gen (z. B. im Rahmen rezidivierender respiratorischer Infekte anderer Genese) von angeborenen Ursachen häufig schwierig.

Aus diesem Grund wird im Folgenden ein aktualisierter Diagnostikleitfaden vorgestellt, der helfen soll, eine adäquate Diagnostik durchzuführen. Aufgrund des rasch zunehmenden Wissens auf den Gebieten der Pathophysiologie und Genetik gehen wir davon aus, dass dieser Leitfaden stetig aktualisiert werden muss.

Klinische Indikationen für die PCD-Diagnostik

Motile Zilien finden sich im respiratorischen Epithel der oberen (Nasopharynx und Mittelohren) und unteren Atemwege. Eine Dysfunktion dieser Zilien verursacht eine gestörte mukoziliäre Clearance. So erklären sich auch

- das Atemnotsyndrom beim Reifgeborenen (bei bis zu 75% der PCD-Patienten),
- eine persistierende Rhinitis/Rhinosinusitis mit Beginn oft in der Neugeborenenperiode (>90%),
- rezidivierende Otitiden mit Otorrhö (60–90%) und

- chronisch produktiver Husten (>90%) mit nachfolgenden Atelektasen, Pneumonien, Bronchitiden und Bronchiektasenbildung [11, 29].

Eine Dysfunktion motiler nodaler Zilien während der embryonalen Entwicklung erklärt Erkrankungsmanifestationen wie Situs inversus (ungefähr 40–50%) und Lateralitätsdefekte mit Asplenie/Polysplenie und komplexen Herzvitien (ungefähr 6%). Die Dysmotilität der Spermienflagellen begründet die hohe Inzidenz von männlicher Infertilität (ungefähr 50%). Die Eileiter sind ebenfalls mit motilen Flimmerhärchen ausgekleidet, was möglicherweise ein gering erhöhtes Risiko für extrauterine Schwangerschaften und eine verminderte weibliche Fertilität erklärt (sehr selten).

Das Ventrikelsystem des Gehirns ist mit Flimmerepithel (Ependymzellen) ausgekleidet. Eine Fehlfunktion der Ependymzilien verursacht bei Mäusen obligat einen Hydrozephalus, wohingegen das diesbezügliche Risiko beim Menschen nur gering erhöht ist (<1%). Defekte nicht beweglicher Zilien können zu vielfältigen Erkrankungen, wie Retinitis pigmentosa, orofaziales digitales Syndrom Typ 1, polyzystischen Nieren- und Lebererkrankungen beitragen [2].

Da einige Erkrankungsmanifestationen der PCD auch bei anderen Ursachen häufig zu finden sind, entschlossen wir uns, oblige und relative Indikationen für die Einleitung der PCD-Diagnostik anzugeben. Das Vorliegen mehrerer typischer Manifestationen (■ Tab. 1) erhöht nach aktuellen deutschen Daten die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer PCD [28].

Screeningverfahren für PCD

Nasale NO-Messung

Hintergrund

Während die NO-Konzentration in den Lungen Gesunder bei einer herkömmlichen diagnostischen Messung eine Konzentration von 25 ppb in der Ausatemluft nicht übersteigt, liegt sie in der Nase physiologischerweise bei mehreren 100 bis über 1000 ppb. Bei Patienten mit PCD sind die Werte des nasalen NO signifikant niedriger als beim Gesunden oder bei Pa-

tienten mit anderen Atemwegserkrankungen [1, 17, 22, 39, 40]. Die Ursache der verminderten nasalen NO-Produktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt [45].

» Die nasale NO-Messung hat eine hohe Sensitivität

Die nasale NO-Messung allein ist für die Diagnosestellung einer PCD nicht ausreichend, weil verschiedene Faktoren zu einer erniedrigten NO-Produktionsrate führen können, ohne dass eine PCD vorliegt. Außerdem ist bei einigen wenigen PCD-Patienten die nasale NO-Produktionsrate normal. Aufgrund der hohen Sensitivität eignet sich die NO-Messung jedoch sehr gut als Screeningmethode.

Methodik

Die Messung des nasalen NO muss mit Hilfe spezieller nasaler Sensoren durchgeführt werden. Derzeit sind hierfür 2 Geräte ausreichend in Studien evaluiert und auf dem Markt etabliert (NIOX Flex®, Fa. Aerocrine, Solna, Schweden; NO Analyzer CLD 88 sp, Fa. Eco Medics, Duernten, Schweiz). Für diese Geräte wurde gezeigt, dass nasale NO-Werte valide und reproduzierbar bestimmt werden können. Deutlich weniger Publikationen finden sich für den Sievers NO Analyzer NOA 280i™ (Fa. GE Analytical Instruments, Urmston, UK). Andere sich auf dem Markt befindlichen Geräte sind für diese Indikation noch nicht ausreichend evaluiert und können derzeit nicht empfohlen werden.

Der Verschluss des Velum palatinum während der Messung ist erforderlich, um die funktionelle Trennung des sinunasalen Raums vom unteren Respirationstrakt zu erreichen und somit die ausschließliche Bestimmung der maximalen nasalen NO-Produktionsrate zu gewährleisten. Aus diesem Grund erfolgt die konventionelle nasale NO-Messung während der Expiration gegen einen Widerstand oder während eines Atemanhaltens („breath hold“). Diese Techniken erfordern eine ausreichende Kooperation des Patienten, um ein stabiles Plateau der nasalen NO-Konzentration von etwa 20 s zu erreichen.

Die konventionelle Messung kann bei kooperativen Patienten ab 5 Jahren mit verlässlichen Ergebnissen durchgeführt

Monatsschr Kinderheilkd 2013 · 161:406–416 DOI 10.1007/s00112-012-2798-y
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

T. Nüßlein · F. Brinkmann · P. Ahrens · M. Ebsen · A. Jung · W. Kirchberger · A. Kneißl · C. Koerner-Rettberg · H. Linz-Keul · N.T. Loges · D. Theegarten · H. Seithe · J. Sendler · C. Werner · H. Omran

Diagnostik der primären ziliären Dyskinesie. Empfehlungen in Zusammenarbeit mit Kartagener-Syndrom und Primäre Ciliäre Dyskinesie e. V.

Zusammenfassung

Charakteristika. Die primäre ziliäre Dyskinesie (PCD) ist eine seltene angeborene Erkrankung der Zilien, die sich zumeist im respiratorischen System manifestiert.

Diagnostik. Bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer PCD und/oder bei positivem Screening (erniedrigte nasale NO-Werte) sollten Patienten zeitnah weitere diagnostische Maßnahmen durchlaufen. In Zentren, in denen eine Hochfrequenzvideomikroskopieanalyse (HVMA) des Zilienschlags zur Verfügung steht, ist eine initiale nasale NO-Messung zum Screening nicht zwingend erforderlich. Als erste diagnostische Maßnahme zur Sicherung oder zum Ausschluss einer PCD sollte eine HVMA erfolgen. Bei auffälligem Befund sind eine transmissionselektronenmikroskopische Analyse (TEM) der Ultrastruktur und eine hochauflösende immunfluoreszenzmikroskopische Analyse (IF) der Zilien anzuschließen. Obligatorisch für die Diagnosestel-

lung sind mindestens 2 kongruente pathologische Befunde aus HVMA, TEM oder IF. Wenn eine PCD-Variante ohne Hinweis auf einen ultrastrukturellen Defekt vorliegt, muss ein identischer pathologischer Zilienschlag mittels HVMA an insgesamt 3 unabhängigen Terminen belegt werden. Danach sollte auf Basis der erhobenen Befunde für HVMA, TEM und IF eine gerichtete genetische Abklärung angestrebt werden. Ein eindeutiger genetischer Befund kann die Diagnose ebenfalls sichern. **Vorgehen.** Bei Verdacht auf eine PCD soll Kontakt mit einem Diagnosezentrum aufgenommen werden. Ein Referenzzentrum für PCD-Diagnostik evaluiert unklare Befunde.

Schlüsselwörter

Zilien · Stickstoffmonoxid (NO) · Hochfrequenzvideomikroskopieanalyse · Transmissionselektronenmikroskopie · Immunfluoreszenzmikroskopie

Diagnostics of primary ciliary dyskinesia. Recommendations in cooperation with the Kartagener's Syndrome and Primary Ciliary Dyskinesia Association

Abstract

Characteristics. Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare congenital disease of the cilia which is mostly manifested in the respiratory system.

Diagnostics. When there is a clinical suspicion of the presence of PCD and/or a positive screening result with reduced nasal nitrogen oxide (NO) values, further diagnostic measures should be initiated as soon as possible. In centers where high-frequency video microscopy analyses (HVMA) of beating of cilia are available, an initial nasal NO measurement for screening must not necessarily be carried out. As the first diagnostic measure for confirmation or exclusion of PCD, HVMA should be carried out. If the findings are conspicuous transmission electron microscopic analysis (TEM) of the ciliary structure and high-resolution immunofluorescence (IF) microscopic analysis of the cilia should follow.

Mandatory for diagnosis are at least two congruent pathological findings from HVMA, TEM or IF. When a PCD variant with no evidence of ultrastructural defects is present, an identical pathological beating of cilia must be demonstrated with HVMA on three independent occasions. Following that a targeted genetic clarification should be attempted based on the findings for HVMA, TEM and IF. A clear genetic result can also confirm the diagnosis. **Approach.** When PCD is suspected contact with a diagnostic center should be made. A reference center for PCD diagnostics will evaluate uncertain findings.

Keywords

Cilia · Nitrogen oxide (NO) · High frequency video microscopy · Transmission electron microscopy · Immunofluorescence microscopy

werden [3]. Bei Kindern zwischen 2 und 5 Jahren kann eine Messung im „tidal breathing“ durch einen Widerstand, z. B. einen Strohhalm („resistance tube“), ver-

sucht werden [16]. Hierbei kommt es bei über 90% der Individuen zu einem unwillkürlichen Verschluss des Velum palatinum sowohl während der In- als auch der Ex-

Tab. 1 Typische Manifestationen der PCD

Altersgruppe	Manifestation	Absolute Indikation zur PCD-Diagnostik	Relative Indikation zur PCD-Diagnostik	Häufig bei PCD-Patienten	Selten bei PCD-Patienten
Alle	Situs inversus (totalis oder partialis)	X		X	
	Heterotaxie (komplexe Lateralitätsdefekte) mit/ohne Herzdefekte mit respiratorischer Symptomatik	X		X	
	Geschwister (v. a. mit respiratorischen Problemen) von PCD-Betroffenen	X		X	
	Ventrikulomegalie und Hydrozephalus aufgrund einer Aquäduktstenose		X		X
	Jungen mit orofazialelem digitalem Syndrom Typ 1	X			X
	Ösophagus- und biliäre Atresie		X		X
Säuglinge	Neonatales RDS, Atelektase beim reifen Neugeborenen	X		X	
	Kontinuierliche Rhinorrhö, beginnend am ersten Lebenstag	X		X	
Kinder	Chronischer feuchter/produktiver Husten mit rezidivierenden Atelektasen (v. a. des Mittellappens) und Pneumonien ungeklärter Genese	X		X	
	Bronchiektasen ungeklärter Genese	X		X	
	Atypisches therapierefraktäres Asthma (v. a. mit feuchtem Husten)	X		X	
	Täglich bestehende therapierefraktäre Rhinitis		X	X	
	Chronische Otitis media mit Ergüssen und Mittelohrschwerhörigkeit		X	X	
	Schwere gastroösophageale Refluxerkrankung		X	X	
	Chronische Sinusitis (ältere Kinder)		X	X	
	Retinitis pigmentosa (Jungen)		X		X
	Polyzystische Nierenerkrankung		X		X
	Jugendliche/Erwachsene	Progrediente Bronchiektasen (betont in Mittellappen/Lingula und Unterlappen)	X		X
Chronische mukopurulente Sputumproduktion		X		X	
Infertilität durch Spermien dysmotilität (v. a. bei gleichzeitig bestehenden respiratorischen Problemen)		X		X	
Progredienter Abfall der Lungenfunktion			X	X	
Uhrglasnägel			X	X	
Polyposis nasi			X	X	
Weibliche Infertilität und Extrauterin gravidität			X		X

Erläuterung der Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

spiration, was eine zuverlässige Messung des nasalen NO-Werts zulässt. Alternativ kann bei unkooperativen Kindern eine Tidal-Breathing-Messung unter Summen oder ohne Atemmanöver durchgeführt werden, womit eine relativ sichere Diskriminierung zwischen PCD- und Nicht-PCD-Patienten erreicht werden kann. Die so erzeugten Messergebnisse sind niedriger als im konventionellen Verfahren [23]. Bei einer Tidal-Breathing-Messung kommt es zwangsläufig zu einer Durchmischung des nasalen mit dem exhalieren NO, was in der Regel zu einem Ausbleiben des NO-Plateaus und zu deutlich niedrigeren gemessenen NO-Werten führt. Liegt der gemessene nasale NO-Wert dennoch auch bei konservativer Beurteilung sicher über den angegebenen Cut-off-Werten, kann von einem unauffälligen Ergebnis ausgegangen werden. Anderenfalls müssen weiterführende diagnostische Methoden herangezogen werden.

Für Kinder unter 2 Jahren steht gegenwärtig keine validierte Messmethode zur Verfügung. Bei ihnen kann jedoch ebenfalls eine einfache Tidal-Breathing-Messung ohne Atemmanöver versucht werden.

Durchführung

Die NO-Messungen sollen nach den aktuellen ATS/ERS-Richtlinien erfolgen [1]. Zusätzlich sind weitere Messkriterien, wie im Folgenden dargestellt, zu beachten, um eine ausreichende Qualität und Aussagekraft der Messergebnisse zu erzielen.

Der Einfluss von topischen und systemischen Medikamenten (abschwellende Nasensprays, Kortikosteroide, hypertone Kochsalzlösung, Antihistaminika, Antibiotika) auf die nasale NO-Konzentration ist nicht ausreichend untersucht. Erste Studienergebnisse suggerieren einen möglichen Effekt auf die NO-Produktionsrate [5, 47]. Idealerweise sollten diese Substanzen deshalb mindestens 7 bis 10 Tage vor

der Untersuchung abgesetzt werden. Falls an den Tagen vor der Messung oder am Messstag topische Medikamente verabreicht wurden, wird bei auffälligen Werten eine Wiederholung der Untersuchung in einem Intervall von mindestens 7 bis 10 Tagen nach Absetzen der Medikation empfohlen.

Da bei Vorliegen einer akuten Rhinitis oder Rhinosinusitis falsch-niedrige nasale NO-Konzentrationen gemessen werden, sollte die Messung erst nach Abklingen der akuten Symptome durchgeführt werden. Bei einigen Patienten mit chronischer nasaler Entzündung und Obstruktion bewährte sich eine Sanierung mit topischen Steroiden und ggf. systemischen Antibiotika vor Durchführung der Messung. Die oben genannten Empfehlungen zum therapiefreien Intervall vor der Untersuchung sollen jedoch auch hier beachtet werden.

Tab. 2 Publierte Referenz- bzw. Cut-off-Werte der nasalen NO-Messung bei Menschen ohne PCD

Referenz	Gerät	Flussrate (l/min)	Konzentration (ppb)	Produktionsrate (nl/min)
Piacentini et al. [41]	NIOX Flex®	0,3	396±169	119±51
Walker et al. [45]	NIOX Flex®	0,3	772 (690–886)	232 (207–266)
Mateos-Corral et al. [23]	CLD 88 sp	0,33	>177	>59

Erläuterung der Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 3 Cut-off-Werte zur Beurteilung der nasalen NO-Konzentration

Unauffälliger Befund	>200 ppb (keine Obergrenze)	Weiterführende PCD-Diagnostik nur bei dringendem klinischem Verdacht auf PCD (z. B. Situs inversus und Bronchiektasen)
Graubereich	100–200 ppb	Weiterführende Diagnostik großzügig erwägen, sofern PCD-verdächtige Symptome bestehen; anderenfalls nasale NO-Messung nach 3 bis 6 Monaten wiederholen
Pathologischer Befund	<100 ppb	Falls im Intervall von mindestens 7 bis 10 Tagen erneut pathologisch: Weiterführende Diagnostik zwingend einleiten Falls eine HVMA zur Verfügung steht, kann diese alternativ zu einer Wiederholung der NO-Messung durchgeführt werden.

➤ **Aufgrund möglicher anatomischer Unterschiede sollte die Messung immer nacheinander an beiden Nasenlöchern durchgeführt werden.**

Die Reproduzierbarkeit des Untersuchungsergebnisses sollte anhand einer weiteren, sich anschließenden Messung überprüft werden.

Die maximale nasale NO-Konzentration wird mittels einer speziell geformten Olive an einer Nasenöffnung während der oralen Expirationsphase oder während eines „breath hold“ gemessen (Velumverschluss). Die gegenüberliegende Nasenöffnung bleibt unverschlossen. Die Messung muss sofort zu Beginn des Atemmanövers begonnen werden, da es sonst durch den fehlenden Fluss im Messgerät zu einer Anschoppung von NO im Nasenraum und in der Folge zu einem falsch hohen Peak des NO in den ersten Sekunden nach Messbeginn kommt.

Die Berücksichtigung der NO-Konzentrationskurve ist zwingend erforderlich, um das Erreichen eines stabilen Plateaus während des Velumverschlusses zu kontrollieren. Die Messung des maximalen nasalen NO erfolgt im stabilen Plateau. Wird dieses nicht erreicht oder zeigt die NO-Kurve einen undulierenden Verlauf, ist dies ein Zeichen für einen unzureichenden Velumverschluss und/oder eine unzureichende Compliance des Patienten. Persistiert das Problem, kann eine Messung mittels „tidal breathing“ über einen Widerstand („resistance tube“) ver-

sucht werden; hierbei kommt es oft zu einer Normalisierung der NO-Kurve und zum Erreichen eines Plateaus.

Referenzwerte

Da für Kinder unter 6 Jahren und unkooperative Patienten bisher keine Normwerte existieren, werden für diese Population die für ältere Kinder und Erwachsene publizierten Cut-off-Werte verwendet. Vorläufige Daten zeigten allerdings eine Altersabhängigkeit der nasalen NO-Werte insbesondere bei Kindern unter 10 Jahren [16, 41].

Die publizierten Referenzwerte für das nasale NO sind heterogen und hängen von der Studienpopulation, der durchgeführten Methode sowie der verwendeten Flussrate ab (■ **Tab. 2**, [23, 45]). Für den klinischen Alltag ist eine Darstellung der gemessenen Konzentration in ppb ausreichend, da sich die Standardflussraten zwischen den beiden Goldstandardgeräten nicht wesentlich unterscheiden. Um jedoch die Messergebnisse geräteunabhängig exakt vergleichen zu können, muss eine Umrechnung in die NO-Produktionsrate in nl/min nach folgender Formel erfolgen:

$$\text{NO-Produktionsrate (nl/min)} = \text{NO-Konzentration (ppb)} \times \text{Flussrate (l/min)}$$

Bei konservativer Schätzung können derzeit die in ■ **Tab. 3** aufgeführten Cut-off-Werte zur Beurteilung der nasalen NO-Konzentration empfohlen werden, um eine relativ sichere Abgrenzung zwischen

PCD- und Nicht-PCD-Patienten zu erreichen [23, 45].

Differenzialdiagnosen erniedrigter nasaler NO-Werte

Abzuklären sind, ob

- anatomische Ursachen,
- zystische Fibrose,
- akute und chronische Rhinitis oder Rhinosinusitis sowie Polyposis nasi und
- Panbronchiolitis

Grund für den NO-Befund sind.

Befunddokumentation

Folgendes muss dokumentiert werden

- Beschwerden, Indikation,
- topische Medikation inklusive Datum der letzten Einnahme,
- verwendetes Gerät, Aspirationsfluss,
- Technik (Expiration gegen Widerstand, „breath hold“, „tidal breathing“ mit/ohne Widerstand),
- Beurteilung der Compliance,
- nasale NO-Konzentration in ppb und NO-Produktionsrate in nl/min,
- Beurteilung und ggf.
- die Empfehlung zur weiterführenden Diagnostik.

Alternative Screeningverfahren

Weitere Verfahren wie der Saccharintest oder die mukoziliäre Clearancemessung mit radioaktiven Markern sind entweder nicht ausreichend sensitiv und spezifisch oder können aufgrund der mit ihnen verbundenen Strahlenbelastung nicht mehr empfohlen werden [3].

In Zentren, in denen eine HVMA zur Verfügung steht, kann diese auch zur initialen Diagnostik ohne vorherige Messung der nasalen NO-Konzentration verwendet werden.

Weiterführende Diagnostik

Gewinnung von respiratorischem Epithel

Hintergrund

Für die PCD-Diagnostik ist eine HVMA der Zilienmotilität von respiratorischen Epithelzellen als Goldstandard anzusehen, da eine Reihe von PCD-Varianten nicht mittels der traditionellen Untersuchungs-

methode (TEM) diagnostiziert werden kann. Aus den respiratorischen Epithelproben können sowohl HVMA als auch TEM als auch IF durchgeführt werden.

Methodik

Die Zellen für die Zilienfunktionsanalyse werden mittels nasaler oder bronchialer Bürstung gewonnen, wobei die nasale Bürstung aufgrund der besseren Zugänglichkeit bevorzugt werden sollte. Die Durchführung einer Bronchoskopie allein zur Probenentnahme für eine PCD-Diagnostik ist nicht indiziert. Werden im Rahmen einer Bronchoskopie bronchiale Gewebeproben zur PCD-Diagnostik entnommen, sollte die Sedierung auch für eine parallel stattfindende Nasenbürstung genutzt werden. Mit einem solchen Verfahren steigt die Wahrscheinlichkeit, für die PCD-Diagnostik ausreichendes Material zu gewinnen.

» Bürstenbiopsien sind gegenüber Zangenbiopsien zu bevorzugen

Zangenbiopsien des nasalen und bronchialen Epithels sind für die Analyse nur eingeschränkt geeignet, da die Visualisierung des Zilienschlags deutlich erschwert ist. Zudem kommt es im Rahmen von Zangenbiopsien häufiger zu Nasenbluten. Aus diesem Grunde sollten bevorzugt Bürstenbiopsien durchgeführt werden.

Vor der Bürstung sollte die Nase gereinigt werden, da eine Verunreinigung durch Schleim/Schmutzpartikel die HVMA, TEM und IF beeinträchtigen kann. Für die Bürstung der Nase wird eine Zervixbürste mit „protective tip“ oder eine für die Bronchoskopie entwickelte Bürste verwendet.

Der Patient schließt jeweils ein Nasenloch und atmet durch die andere Nasenöffnung. Auf diese Weise wird geprüft, ob ein Nasenloch verlegt oder verengt ist. Die Bürstung erfolgt in der Regel in dem Nasengang mit dem geringsten Atemwegswiderstand. Bei Verdacht auf eine Obstruktion sollte eine Inspektion des Nasengangs mittels Oto- oder Rhinoskop erfolgen. Die Bürste wird mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung oder Aqua dest. befeuchtet

und waagrecht, in den unteren Nasengang zielend, in die Nase eingeführt. Während der Bürstung sollte der Kopf des Patienten gehalten werden, um Verletzungen durch Kopfbewegungen bei eingeführter Bürste zu vermeiden. Trifft man bei deren Einführen auf einen Widerstand (Raumforderung, z. B. obstruierender Polyp), sollten die Untersuchung abgebrochen und die Gegenseite gebürstet werden. Die Bürste sollte soweit eingeführt werden, bis der Bürstenkopf im Bereich der Nasenkonchae liegt. Durch vorsichtiges und schnelles Drehen und Reiben (etwa 2- bis 3-mal vor und zurück) werden dort respiratorische Epithelzellen abgestreift.

Die Nasenbürstung dauert nur wenige Sekunden und wird von den Betroffenen als unangenehm empfunden. Häufig kommt es zum reflektorischen Tränenfluss. Nach etwa 20 s sistiert der Schmerz. Für die HVMA und/oder die IF wird die Bürste unmittelbar nach der nasalen Bürstung (Austrocknung muss vermieden werden!) in ein Falcon™-Röhrchen mit Zellmedium (5 ml RPMI 1640, auf 37°C

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

vorgewärmt) gesteckt und mehrfach mit leichten Bewegungen ausgeschüttelt. Für die TEM wird die Bürste in einem Röhrchen mit gepufferter Glutaraldehydlösung (2,5%) ausgeschlagen, sie kann hierbei auch im Gefäß verbleiben. 0,9%ige NaCl-Lösung und Formalin sind als Transport- oder Untersuchungsmedien für HVMA, TEM und IF ungeeignet.

Befunddokumentation

Sie beinhaltet:

- Entnahmeort (nasal, bronchial),
- Entnahmetechnik (Bürste/Zange),
- Vorhandensein/Nichtvorhandensein einer sichtbaren Inflammation (z. B. Schwellung, Rötung, Sekret, Verletzlichkeit) und
- Medikamentenanamnese.

Kontraindikationen

Relative Kontraindikationen sind

- akute Rhinitis und Exazerbation einer chronischen Rhinosinusitis, da häufig kein zilientragendes oder sekundär verändertes Gewebe gewonnen wird, sowie
- Blutungsneigung, bei welcher zumindest Vorkehrungen getroffen werden müssen, um eine mögliche Blutung stillen können.

Bekannte nasale Enzephalozele oder andere Raumforderung stellen absolute Kontraindikationen der Gewinnung von respiratorischem Epithel dar.

Komplikationen

Selten kommt es zur

- Epistaxis (seltener als 1:100 bei erfahrenem Untersucher),
- Verletzung einer nasalen Enzephalozele (absolute Rarität), die von einer Meningitis gefolgt sein kann, oder
- Verletzung einer anderen Raumforderung (absolute Rarität), die mit einer erhöhten Blutungs- oder Infektionsgefahr assoziiert ist.

Hochfrequenzvideomikroskopische Analyse

Hintergrund

Die HVMA der aus respiratorischem Epithel gewonnenen Zilien dient der Analyse von Schlagfrequenz und -muster. Sie ent-

spricht dem Goldstandard bei der PCD-Diagnostik [8, 10] und besitzt aufgrund ihrer hohen Sensitivität einen beträchtlichen Stellenwert. Die Methode ist als essenzieller Baustein der PCD-Diagnostik anzusehen, da sie auch funktionelle (ultrastrukturell nicht fassbare) PCD-Variationen erfasst [9].

Aufgrund der Möglichkeit sekundärer Zilienschlagveränderungen z. B. im Rahmen akuter/chronischer Infektionen der Atemwege oder Medikamentennebenwirkungen ist der positive Vorhersagewert für die Diagnose PCD geringer. Aus diesem Grund sollte diese mit den weiteren Methoden (TEM und IF) bestätigt werden. In den Fällen, in denen keine TEM- oder IF-Auffälligkeiten nachgewiesen werden können, ist die Diagnose auch allein mit HVMA zu stellen. In diesen Fällen sollte jedoch im infektfreien Intervall an 3 separaten Terminen in der HVMA ein identischer Zilienschlagdefekt nachgewiesen werden.

Methodik

Die Versendung von zilientragenden Zellen zur HVMA ist prinzipiell möglich. Es kommt jedoch zu einem zunehmenden Verlust der Zilienschlagfunktion und daher bei abnormem Befund zu einer begrenzten Aussagekraft des Untersuchungsergebnisses.

Die bei der Nasenbürstung gewonnenen zilientragenden Zellen werden bei Raumtemperatur in der Regel direkt aus dem Medium mit der Bürste auf einen Objektträger aufgebracht und zeitnah (d. h. am besten sofort oder innerhalb weniger Minuten) mit einem inversen oder aufrechten Mikroskop beurteilt. Das verwendete Mikroskop muss eine Möglichkeit zur digitalen Hochfrequenzmessung mit Darstellung und Speicherung von mindestens 100 Bildern/s in hoher räumlicher Auflösung bieten. Die Vergrößerung soll eine ausreichende Darstellung ermöglichen (ab 40-facher Vergrößerung gewährleistet). Höhere Vergrößerungen (z. B. 100:1) können dazu führen, dass je nach Aufsicht der Zilienschlag verkürzt erscheint, da dessen Beginn und Ende außerhalb des Fokusbereichs liegen können. Durch verlangsamte Wiedergabe bis hin zur Bild-für-Bild-Analyse kann die Zilienaktivität qualitativ und quantitativ hinsichtlich Schlagmuster und

-frequenz beurteilt werden. Für die Auswertung der Zilienschlagfrequenz können kommerzielle Computerprogramme [z. B. SAVA („Sisson-Ammons video analysis“), Ammons Engineering, Mt. Morris, USA] verwendet werden.

Maßgeblich für die Untersuchungen ist die Beurteilung von mindestens 10 *Kanten* von Zellverbänden, falls möglich. Hier kann die Zilienbewegung *von der Seite aus* beurteilt werden. Weiterhin sollte der Zilienschlag ebenfalls zumindest einmal *von oben* untersucht werden, da nur so aberrante zirkuläre Schlagmuster identifiziert werden können.

Der Nachweis von Partikeltransport ist kein sicherer Hinweis für das Vorliegen einer normalen Zilienschlagfunktion.

Losgelöste singuläre Zellen zeigen häufig eine Alteration des Zilienschlags. Weisen sie jedoch eine normale Funktion oder spezifische Zilienalterationen auf, sollten diese berücksichtigt werden.

Zilienschlag, Schlagmuster, Sekrettransport und Frequenz sind als Video zu dokumentieren und zu archivieren.

Befunddokumentation

Sie umfasst:

- das verwendete Mikroskop,
- die Medikation des Patienten,
- die Untersuchungstemperatur,
- die Qualität des Materials (Anteil der zilientragenden Zellen im Verband),
- die Analyseparameter, d. h. die Frequenz (Bilder/s),
- die qualitative Zilienaktivität (Partikeltransport, rotierende Aggregate),
- die Schlagfrequenz (minimal, maximal, Mittelwert in Hz),
- das Schlagmuster (Koordination, Amplitude) sowie
- eine abschließende Beurteilung und Interpretation (primäre oder sekundäre Zilienfunktionsstörung, Normalbefund).

Transmissionselektronenmikroskopie

Hintergrund

Ursprünglich stellte die TEM den alleinigen Goldstandard bei der PCD-Dia-

agnostik dar [13, 43]. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass zahlreiche PCD-Varianten regelhaft keine ultrastrukturell detektierbaren Veränderungen aufweisen. Hierunter fallen funktionelle Zilienschlagdefekte (z. B. verursacht durch *DNAH11*-Mutationen; [42]). Und Mutationen, welche die Komposition des mit dem zentralen Tubuluspaar assoziierten Proteinkomplexes beeinflussen (*HYDIN*; [33]), sind nur mittels elektronenmikroskopischer Tomographie eindeutig zu detektieren. Eine solche Diagnostik ist jedoch für den Routineeinsatz zu aufwändig. Der DRC, auch als Nexinbrücken bezeichnet, ist kaum mittels TEM darstellbar, weshalb Mutationen (z. B. *CCDC164*, [46]), die diesen Komplex betreffen, meist unentdeckt bleiben. Weiterhin führen einige genetische Defekte nur zu regionalen Veränderungen entlang des Zilienschafte und können daher bei der TEM-Analyse leicht übersehen werden (z. B. *KTU*-Mutationen) [34]. In der Regel werden zusätzlich eine Reihe von ultrastrukturellen Auffälligkeiten wie unspezifische und unsystematische Tubulusaberrationen, Verbundzilien („compound cilia“) oder axonemale Blasenbildungen („axonemal blebs“) gefunden, welche sekundärer Natur und nicht pathognomonisch für die PCD sind [32, 37, 47]. Aufgrund geringer Elektronendensität lassen sich IDA häufig nur schwer darstellen. Bis zu 30% des Materials, welches zur Untersuchung gelangt, ist nicht diagnostisch verwertbar, da Metaplasien dominieren oder sich nur Schleim mit Entzündungszellen findet [37, 44]. In großen Kollektiven wird in 3–5% der Fälle trotz angegebenem Situs inversus, Kartagener-Syndrom oder Dextrokardie eine regelhafte Ultrastruktur gesehen, dies zeigt die Notwendigkeit der weiteren Abklärung mit der HVMA [37, 44].

Um einen ausreichenden Qualitätsstandard zu gewährleisten, sollten nur versierte Institute mit hoher Expertise in der Zilienbeurteilung mit diesen Untersuchungen beauftragt werden.

Methodik

Die Probengewinnung erfolgt wie oben beschrieben. Entscheidend für die Qualität des Materials ist, dass der Bürstenabstrich und die Nasenbürste sofort nach

der Materialgewinnung in einer für TEM geeigneten Lösung, z. B. in mit 2,5%igem Phosphat gepuffertem Glutaraldehyd (nicht Kulturmedium, nicht NaCl 0,9%, kein Formalin) fixiert wird.

Die Transportzeit der Proben sollte so kurz wie möglich sein.

Da Fixierlösungen altern, sollten diese zur längerfristigen Verwendung im Tiefkühlschrank (–20°C) aufbewahrt und direkt vor dem Gebrauch aufgetaut werden. Bei verspätet abgesandten Proben (z. B. am Wochenende) ist eine zwischenzeitliche Aufbewahrung im Kühlschrank zu empfehlen. Extreme Schleimmengen können die TEM erschweren. Die Abnahmezeit sollte durch den Einsender auf dem Einsendeschein dokumentiert werden. Die Probenverarbeitung sollte nach einem standardisierten Protokoll erfolgen. Für eine Beurteilung der Ultrastruktur sollten mindestens 20 beurteilbare orthograd angeschnittene Zilien (Schaft und Basis) zur Verfügung stehen. Bei geringerer Zilienzahl kann nur eine Verdachtsdiagnose ausgesprochen werden [37, 44].

Bei Verdacht auf einen IDA-Defekt muss dieser Befund in einer erneuten Bürstenbiopsie mittels TEM bestätigt werden [30]. Auch bei florider Entzündung und/oder sekundären Veränderungen ist eine Wiederholungsuntersuchung zu fordern [37].

Zum Nachweis des Ergebnisses sollte eine Fotodokumentation erfolgen, insbesondere bei pathologischem Befund. Darüber hinaus müssen Semi- und Ultradünnschnitte sowie die Blöcke mindestens 10 Jahre asserviert werden, um evtl. Nachuntersuchungen durchführen zu können.

Befunddokumentation

Sie beinhaltet:

- die Anzahl der beurteilbaren orthograd angeschnittenen Zilien,
- die nachgewiesenen primären Ultrastrukturdefekte:
 - Dyneinarmdefekte:
 - a) Defekte der IDA und/oder
 - b) der ODA,
 - Tubulusdisorganisationsdefekte mit Verlagerung der Zentraltubuli,

- Tubulusdefekte (Dislokationen und Aberrationen)
 - a) der peripheren Doppelröhren,
 - b) der Zentralröhren (z. B. 9+0-Zilien, ziliäre Transpositionsdefekte),
- andere Defekte: Orientierung, Länge (können primärer und sekundärer Natur sein).
- Kombinationsdefekte (z. B. ODA+IDA, Tubulusdisorganisationsdefekte+IDA),
- sekundäre Veränderungen (axonemale Blasen, Compoundzilien, einzelne Tubulusaberrationen) sowie
- die Beurteilung:
 - regelrecht,
 - Defekt typisch für PCD, Verdacht auf PCD, mögliche PCD,
 - sekundäre Veränderungen,
 - Wiederholung erforderlich (mit Begründung).

Immunfluoreszenzmikroskopie

Hintergrund

Die hochauflösende IF ist eine Methode mit guter Sensitivität und Spezifität, die ergänzend zur Elektronenmikroskopie wichtige Informationen über strukturelle Zilienveränderungen liefert [14]. Dies kann besonders bei der Diagnostik von Defekten der IDA und Nexinbrücken hilfreich sein. Weiterhin erlaubt die Methode auch die Detektion regionaler ODA-Defekte. Im Gegensatz zur HVMA können jedoch keine funktionellen Zilienveränderungen detektiert werden. Defekte der zentralen Tubulusröhren sind bislang nicht mittels IF diagnostizierbar.

Die Ergebnisse der IF können wie die der TEM die PCD-Diagnose bestätigen

Bei der IF wird durch Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern die axonemale Proteinkomposition untersucht. Bei ODA- und IDA-Defekten fehlen innerhalb der Zilien Bestandteile dieser Eiweißkomplexe. Bei Defekten der Tubulusorganisation kommt es zum Verlust von IDA-Komplexen sowie Proteinen der Nexinbrücken (DRC-Proteine). Die Er-

gebnisse dieser Methode korrelieren sehr gut mit den genetischen und durch TEM erhobenen Diagnosen [14, 46] und können daher wie die TEM die PCD-Diagnose bestätigen. In Ergänzung zur TEM können auch regionale Defekte der ODA- und IDA-Komplexe erkannt werden. Aus diesem Grunde können mit der IF auch axonemale Defekte nachgewiesen werden, die in der TEM Normalbefunde aufweisen können [33, 34, 36, 46]. Aktuell werden Antikörper gegen ODA und DRC-Proteine routinemäßig eingesetzt. Bei Auffälligkeiten erfolgt eine zusätzliche Analyse mit Anti-DNALII (IDA).

Methodik

Die Probengewinnung erfolgt wie oben beschrieben. Proben, die in 0,9%igem NaCl suspendiert werden, sind für die IF-Methode nicht verwertbar, da durch physiologische Kochsalzlösung axonemale Bestandteile wie Dyneinproteine aus den Zilien extrahiert werden. Für die IF müssen die Zellen immer in Zellmedium (5 ml RPMI 1640) suspendiert werden. Direkt nach ihrer Gewinnung sollte die Probe zunächst lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von Zilien untersucht werden, um absehbar frustrane IF-Arbeitsschritte zu vermeiden. Wenn viel Sekret an der Bürste verbleibt, sollte diese ausgeschlagen werden und das Austropfen auf den Objektträger mit einer neuen Bürste erfolgen. Die gesamte Zellsuspension wird auf mindestens 25 mit einem Bleistift namentlich beschrifteten Objektträgern ausgetropft. Diese werden an der Luft getrocknet und sollten innerhalb von 24 h verschickt werden.

Weiterhin wird bei jeder Färbung auch immer eine Kontrollbiopsie mituntersucht. Auffällige Befunde werden in einer zweiten Färbung bestätigt. Eine Fotodokumentation erfolgt bei allen abnormen Befunden.

Befunddokumentation

Sie sollte enthalten:

- Verwertbarkeit des Materials,
- Hinweis auf eine der folgenden 4 aktuell darstellbaren Klassen von Defekten:
 - I. isolierte Defekte des ODA:
 - a) des gesamten Axonems (z. B. *DNAH5*- und *DNAI2*-Mutationen, [20, 31]),

Tab. 4 Bekannte genetische PCD-Varianten

Gen	Genort	Struktureller Defekt	Exons	Phänotyp
<i>DNAH5</i>	5p15	ODA	79+1	PCD+KS
<i>DNAH11</i>	7p15.3–21	Normal	82	PCD+KS
<i>DNAI1</i>	9p21–p13	ODA (partiell)	20	PCD+KS
<i>DNAI2</i>	17q25.1	ODA	14	PCD+KS
<i>TXNDC3</i>	7p14.1	ODA (partiell)	18	KS
<i>DNAL1</i>	14q24.3	ODA	8	PCD+KS
<i>CCDC114</i>	19q13.33	ODA	14	PCD+KS
<i>CCDC103</i>	17q21.31	ODA (partiell)	4	PCD+KS
<i>KTU (DNAAF1)</i>	14q21.3	ODA und IDA (partiell)	3	PCD+KS
<i>LRRC50 (DNAAF2)</i>	16q24	ODA und IDA	12	PCD+KS
<i>DNAAF3</i>	19q13	ODA und IDA	12	PCD+KS
<i>LRRC6</i>	8q24.22	ODA und IDA	12	PCD+KS
<i>HEATR2</i>	7p22.3	ODA und IDA	13	PCD+KS
<i>CCDC39</i>	3q26.33	IDA und DRC	20	PCD+KS
<i>CCDC40</i>	17q25.3	IDA und DRC	20	PCD+KS
<i>CCDC164</i>	2p23.3	DRC	17	PCD+KS
<i>HYDIN</i>	16q22.2	Partieller Defekt eines mit dem zentralen Tubuluspaar assoziierten Proteinkomplexes	86	PCD
<i>RPGR</i>	Xp21.1	Variabel	Ungefähr 25	PCD+Retinitis pigmentosa
<i>OFD1</i>	Xp22	Nicht bekannt	23	PCD+mentale Retardierung
<i>RSPH9</i>	6p21	Zentrales Tubuluspaar (partiell)	5	PCD
<i>RSPH4A</i>	6q22	Zentrales Tubuluspaar	6	PCD

Erläuterung der Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

- b) des distalen Axonems (z. B. *DNAI1*- und *CCDC103*-Mutationen, [38]),
- II. Defekte der ODA und der IDA:
 - a) des gesamten Axonems (z. B. *LRRC50*- und *DNAAF3*-Mutationen, [21]),
 - b) partieller Axonemregionen (z. B. *KTU*-Mutationen, [46]),
- III. Defekte der Mikrotubulusorganisation
 - a) inklusive von IDA (z. B. *CCDC39*- und *CCDC40*-Mutationen, [4, 25]) und
- IV. isolierte Nexinbrückendefekte mit normaler IDA-Komposition (z. B. *CCDC164*-Mutationen) [46].

Genetische Analyse

Hintergrund

Die genetische Analyse ist zur eindeutigen Diagnosesicherung sinnvoll und erlaubt eine adäquate genetische Beratung. Ähnlich wie bei der Mukoviszidose kön-

nen zukünftig bei der PCD möglicherweise pharmakogenetische Therapien zum Einsatz kommen. Hierfür ist die Kenntnis der spezifischen Mutation unabdingbar, um potenzielle neue therapeutische Optionen entwickeln zu können.

Die Vererbung der PCD ist heterogen, da es sich um eine Gruppe verschiedener Erkrankungen unterschiedlicher zugrunde liegender genetischer Defekte handelt (Tab. 4).

Die häufigsten Mutationen werden autosomal-rezessiv, wenige X-chromosomal rezessiv vererbt.

Es ist inzwischen möglich, bei etwa 50% der Patienten eine relevante Mutation nachzuweisen (s. unten). Für autosomal-rezessiv vererbte PCD-Varianten wurden bislang 19 Gene entdeckt. Davon kodieren 7 für Komponenten des ODA: *DNAI1* [38], *DNAI2* [20], *DNAH5* [42], *DNAH11* [33], *DNAL1* [24], *CCDC103* [36] sowie *TXNDC3* [12], und 3 für zytoplasmatisch

lokalisierte Proteine, die für die Assemblierung der ODA-/IDA-Komplexe essenziell sind: *KTU* (*DNAAF1*; [34]), *LRRC50* (*DNAAF2*; [20]) und *DNAAF3* [26]. Bei weiteren 3 Genen ist die Lokalisation innerhalb der Atemwegszelle unbekannt, die Gene sind jedoch für die Assemblierung des ODA (*CCDC114*; [18, 35]) bzw. der IDA und der ODA essenziell (*LRRC6* [19] und *HEATR2* [15]).

Mutationen der Gene *CCDC39* [25] und *CCDC40* [4] bewirken eine Mislokalisierung des zentralen Tubuluspaars und der peripheren Doppelröhren sowie eine defiziente Assemblierung der IDA und des DRC (Nexinbrücken). Daher kommt es bei ihnen zu schweren Tubulusdisorganisationsdefekten, die mit einem steifen Zilienschlag einhergehen.

Mutationen des Gens *CCDC164* [46], welches für einen Bestandteil des DRC kodiert, führen zum isolierten Verlust der Nexinbrücken, was in einem Zilienschlag mit verminderter Amplitude und erhöhter Frequenz resultiert.

HYDIN ist ein Bestandteil des zentralen Proteinkomplexes. Mutationen des korrespondierenden Gens [33] führen zum Verlust dieses Proteins. Bei weitgehend normaler Frequenz ist der Zilienschlag auffällig.

Weiterhin sind 2 Gene bekannt, deren Mutation ursächlich für eine gestörte Funktion des zentralen Tubuluspaars sind: *RSPH9* und *RSPH4A* [7]. Mutationen dieser Gene, die für dem zentralen Tubuluspaar nahe Radialspeichen kodieren, können für einen transienten Verlust des Zentraltubuluspaars (9+0-Muster) und zu einem Transpositionsdefekt (8+1-Muster) führen, bei dem ein zentrales Tubuluspaar durch einen peripheren Doppeltubulus ersetzt wird. Leider zeigen die meisten Zilienquerschnitte keinerlei pathognomonische Veränderungen, sodass die TEM häufig völlig normale Befunde liefert. Das Schlagmuster ist hingegen aufgrund eines rotatorischen Zilienschlags auffällig.

Einen X-chromosomal gekoppelten Vererbungsgang zeigen 2 Gene, die neben PCD auch mit anderen gravierenden Erkrankungen (Retinitis pigmentosa, orales faciales Syndrom Typ 1) assoziiert sind: *RPGR* [27] und *OFDI* [6].

Bei den meisten PCD-Patienten ist ein Defekt des ODA nachweisbar. In der Hälfte

der Fälle sind hierfür *DNAH5*-Mutationen ursächlich.

Es ist davon auszugehen, dass bei der Analyse einer großen Anzahl von PCD-Patienten weitere, bislang unbekannt Sequenzvarianten und neue Gendefekte entschlüsselt werden. Im Einzelfall muss belegt werden, ob Sequenzvarianten Polymorphismen oder Mutationen darstellen.

Nach aktuellem Stand sollte die genetische Analyse als letzter diagnostischer Schritt nach HVMA, TEM und IF angestrebt werden [3, 13]. Einen besonderen Stellenwert hat die IF-Diagnostik, da mit dieser in Kombination mit der HVMA eine gezielte genetische Diagnostik veranlasst werden kann.

Methodik

Nach schriftlicher Aufklärung sollten zur gezielten Diagnostik 2–5 ml EDTA-Blut des Patienten an das genetische Labor versandt werden. Eine genetische Untersuchung bei klinisch unauffälligen Geschwistern ist nach aktueller Gesetzeslage in Deutschland nicht erlaubt. Nach Erhalt des genetischen Befunds soll eine fachgenetische oder genetische Beratung erfolgen.

Entscheidend für ein verwertbares Ergebnis ist eine ausreichende Erfahrung des Labors, da viele DNA-Sequenzvarianten, die für Aminosäureaustausche kodieren, ohne Relevanz sind. Der genetische Befund muss mit den erhobenen Befunden (HVMA, IF und TEM) vereinbar sein. Divergente Befunde müssen erneut evaluiert werden.

In-vitro-Ziliogenese

In den Fällen, in welchen HVMA, TEM und IF nicht zu einer eindeutigen PCD-Diagnose beitragen können, ist die Untersuchung von angezüchteten Zellen (primäre Zellkultur) sinnvoll. Bei anhaltender Azilie, z. B. im Rahmen von Entzündungen der Nasenschleimhaut, bietet die Zellkultur mit In-vitro-Ziliogenese die Möglichkeit, sekundäre Defekte auszuschließen und pathognomonische Befunde zu bestätigen oder neuartige Defekte zu identifizieren [13].

Beurteilt werden primäre Kulturen von Atemwegszellen, die durch eine Nasenbürstung gewonnen wurden. Operativ gewonnene Gewebeproben (z. B. bei Polypekto-

mie) können ebenfalls verwendet werden. Die Ziliogenese kann mittels besonderer Zellkulturbedingungen induziert werden.

Integrierte Beurteilung der Befundkonstellation

Bei der Gesamtbeurteilung sollte berücksichtigt werden, dass die erhobenen Befunde (HVMA, TEM, IF) mit den anderen diagnostischen Ergebnissen vereinbar sein müssen, z. B. ein ODA-Defekt sollte, wenn er in der TEM nachweisbar ist, auch in der IF nachgewiesen werden können. Bei inkongruenten Befunden ist eine Wiederholung der Untersuchung mittels HVMA, TEM und IF anzustreben.

Referenzzentrum und Patientenregister

Die oben dargelegten Ausführungen veranschaulichen die Schwierigkeiten bei der PCD-Diagnostik. Gegenwärtig führt diese diagnostische Komplexität häufig zu falsch-positiven und falsch-negativen Befunden. Die Universitätskinderklinik Münster (Ansprechpartner Prof. Dr. H. Omran) steht als PCD-Diagnostik-Referenzzentrum im Sinne einer Qualitätssicherung zur Verfügung. Das Referenzzentrum arbeitet innerhalb eines Netzwerks eng mit anderen Diagnostikzentren zusammen. Diese können unklare Befunde in ihrer Gesamtkonstellation dem Referenzzentrum zur Einholung einer zweiten Meinung vorstellen.

Das Zentrum in Münster baut mit Unterstützung des Kartagener-Syndrom und Primäre Ciliäre Dyskinesie e. V. ein nationales und europäisches PCD-Register auf. In ihm werden Krankheitsverläufe verfolgt, und es wird klinische Studien zur Etablierung evidenzbasierter PCD-Therapien erleichtern.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. H. Omran
Allgemeine Pädiatrie,
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin,
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A1,
48149 Münster
Heymut.Omran@ukmuenster.de

Interessenkonflikt. Keine Angaben

Literatur

- American Thoracic Society, European Respiratory Society (2005) ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 171:912–930
- Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006) The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:125–148
- Barbato A, Frischer T, Kuehni CE et al (2009) Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J* 34(6):1264–1276
- Becker-Heck A, Zohn IE, Okabe N et al (2011) The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for motile cilia function and left-right axis formation. *Nat Genet* 43:79–84
- Bencova A, Vidan J, Rozborilova E et al (2012) The impact of hypertonic saline inhalation on mucociliary clearance and nasal nitric oxide. *J Physiol Pharmacol* 63:309–313
- Budny B, Chen W, Omran H et al (2006) A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome. *Hum Genet* 120:171–178
- Castleman VH, Romio L, Chodhari R et al (2009) Mutations in radial spoke head protein genes *RSPH9* and *RSPH4A* cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *Am J Hum Genet* 84:197–209
- Chilvers MA, O'Callaghan C (2000) Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax* 55:314–317
- Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C (2003) Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J Allergy Clin Immunol* 112(3):518–524
- Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C (2003) Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. *Thorax* 58:333–338
- Coren ME, Meeks M, Morrison I et al (2002) Primary ciliary dyskinesia: age at diagnosis and symptom history. *Acta Paediatr* 91:667–669
- Duriez B, Duquesnoy P, Escudier E et al (2007) A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3336–3341
- Ferkol T, Mitchison HM, O'Callaghan C et al (2006) Chapter 16. Current issues in the basic mechanisms, pathophysiology, diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Respiratory diseases in infants and children. Eur Respir Soc Mon* 37:291–313
- Fliegau M, Olbrich H, Horvath J et al (2005) Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 171(12):1343–1349
- Horani A, Druley TE, Zariwala MA et al (2012) Whole-exome capture and sequencing identifies *HEATR2* mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 91:685–693
- Jung A, Geidel C, Moeller A et al (2011) Nasal NO measurement in preschool children: feasibility and validation of a tidal breathing technique via a resistance tube. 33. Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie, Graz
- Karadag B, James AJ, Gültekin E et al (1999) Nasal and lower airway level of nitric oxide in children with primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 13:1402–1405
- Knowles MR, Leigh MW, Ostrowski LE et al (2013) Exome sequencing identifies mutations in *CCDC114* as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 92:99–106
- Kott E, Duquesnoy P, Copin B et al (2012) Loss-of-function mutations in *LRRC6*, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 91:958–964
- Loges NT, Olbrich H, Fenske L et al (2008) *DNAI2* mutations cause primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *Am J Hum Genet* 83(5):547–558
- Loges NT, Olbrich H, Becker-Heck A et al (2009) Deletions and point mutations of *LRRC50* cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects. *Am J Hum Genet* 85:883–889
- Lundberg JO, Weitzberg E, Nordvall SL et al (1994) Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur Respir J* 7:1501–1504
- Mateos-Corral D, Coombs R, Grasemann H et al (2011) Diagnostic value of nasal nitric oxide measured with non-velum closure techniques for children with primary ciliary dyskinesia. *J Pediatr* 159:420–424
- Mazor M, Alkrinawi S, Chalifa-Caspi V et al (2011) Primary ciliary dyskinesia caused by homozygous mutation in *DNAL1*, encoding dynein light chain 1. *Am J Hum Genet* 88:599–607
- Merveille AC, Davis EE, Becker-Heck A et al (2011) *CCDC39* is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat Genet* 43:72–78
- Mitchison HM, Schmidts N, Loges NT et al (2012) Mutations in axonemal dynein assembly factor *DNAAF3* cause primary ciliary dyskinesia. *Nat Genet* 44:381–389
- Moore A, Escudier E, Roger G et al (2006) *RPGR* is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 43:326–333
- Noll EM, Rieger CH, Hamelmann E et al (2011) Questionnaire to preselect patients with a high probability of primary ciliary dyskinesia. *Klin Padiatr* 223(1):22–26
- Noone PG, Leigh MW, Sannuti A et al (2004) Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *Am J Respir Crit Care Med* 169:459–467
- O'Callaghan C, Rutman A, Williams GM et al (2011) Inner dynein arm defects causing primary ciliary dyskinesia: repeat testing required. *Eur Respir J* 38(3):603–607
- Olbrich H, Häffner K, Kispert A et al (2002) Mutations in *DNAH5* cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat Genet* 30:143–144
- Olbrich H, Horvath J, Fekete A et al (2006) Axonemal localization of the dynein component DNAH5 is not altered in secondary ciliary dyskinesia. *Pediatr Res* 59(3):418–422
- Olbrich H, Schmidts M, Werner C et al (2012) Recessive *HYDIN* mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry. *Am J Hum Genet* 91(4):672–684
- Omran H, Kobayashi D, Olbrich H et al (2008) *Ktu/PF13* is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* 456:611–616
- Onoufriadis A, Paff T, Antony D et al (2013) Splice-site mutations in the axonemal outer dynein arm docking complex gene *CCDC114* cause primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 92:88–98
- Panizzi JR, Becker-Heck A, Castleman VH et al (2012) *CCDC103* mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nat Genet* 44:714–719
- Papon JF, Coste A, Roudot-Thoraval F et al (2010) A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 35:1057–1063
- Pennarun G, Escudier E, Chapelin C et al (1999) Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 65:1508–1519
- Pfifferer M, Bush A, Maggi F et al (2011) Nasal nitric oxide and nitric oxide synthase expression in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 37(3):572–577
- Pfifferer M, Caramella D, Cangioti AM et al (2007) Nasal oxide in atypical primary dyskinesia. *Chest* 131:870–873
- Piacentini GL, Bodini A, Peroni DG et al (2010) Nasal nitric oxide levels in healthy pre-school children. *Pediatr Allergy Immunol* 21:1139–1145
- Schwabe GC, Hoffmann K, Loges NT et al (2008) Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by *DNAH11* mutations. *Hum Mutat* 29:289–298
- Stannard WA, Chilvers MA, Rutman A et al (2010) Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 181(4):307–314
- Theegarten D, Ebsen M (2011) Ultrastructural pathology of primary ciliary dyskinesia: report about 125 cases in Germany. *Diagn Pathol* 6:115
- Walker WT, Jackson CL, Lackie PM et al (2012) Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 40:1024–1032
- Wirschell M, Olbrich H, Werner C et al (2013) The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nat Genet* 45(3):262–268
- Yamada T, Yamamoto H, Kubo S et al (2012) Efficacy of mometasone furoate nasal spray for nasal symptoms, quality of life, rhinitis-disturbed sleep, and nasal nitric oxide in patients with perennial allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 33:e9–e16