Das Erregerspektrum pulmonaler MALT-Typ-Lymphome

Eine 16S-rRNA-basierte Analyse der mikrobiellen Diversität

Extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom Typ des mukosa-assoziierten Lymphgewebes (eMZBCL) sind eine Entität extranodaler Lymphome, die morphologisch Ähnlichkeiten mit der Zellpopulation der Marginalzone der Peyer-Plaques des Dünndarms aufweisen. Sie bestehen aus einer gemischten Population aus zentrozytenähnlichen kleinen B-Zellen, monozytoiden Zellen und eingestreuten Zellen, die in ihrer Morphologie Immunoblasten und Zentroblasten ähneln (Abb. 1). eMZBCL machen etwa 8% aller B-Zell-Lymphome aus [12] und entstehen im Gegensatz zu anderen Non-Hodgkin-Lymphomen nicht in den Lymphknoten oder in Organen mit primär angelegtem lymphatischen Parenchym, sondern in Organen, die unter physiologischen Bedingungen meist kein mukosaassoziiertes Lymphgewebe (MALT) aufweisen. eMZBCL wurden in zahlreichen anatomischen Lokalisationen beschrieben (s. unten), und für einzelne dieser Lokalisationen ist eine Assoziation mit einem chronischen Entzündungsprozess oder mit bakteriellen oder viralen Erregern (z. B. *Helicobacter pylori* im Magen) beschrieben. In der Lunge wurde eine solche Assoziation

zwischen der Lymphomgenese und einem definierten assoziierten Erreger bislang nicht gefunden.

In der vorliegenden Studie haben wir mit Hilfe einer molekularbiologischen Screeninguntersuchung 9 Fälle von pulmonalen eMZBCL bezüglich ihrer mikrobiologischen Diversität untersucht und mit 9 Kontrollfällen (normale fetale Lunge, Pneumonie, Karzinoid) verglichen. Ziel war eine umfassende Charakterisierung des in den jeweiligen Lungengeweben enthaltenen Erregerspektrums sowie die Herausarbeitung möglicher Unterschiede, um mögliche mit der Manifestation pulmonaler eMZBCLs assoziierte Erreger zu definieren.

Material und Methoden

Gewebeproben

Gewebeproben von 9 Patienten mit pulmonalen eMZBCLs und 9 Kontrollgewebeproben (1 Karzinoid, 2-mal Lungenemphysem, 3 eitrige Bronchopneumonien und 3 fetale Lungen) wurden in diese Studie eingeschlossen. Alle Lymphomfälle wurden reevaluiert und entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation reklassifiziert. Das Patientenkollektiv umfasste 6 Männer und 3 Frauen mit einem medi-

anen Alter von 56 Jahren (29–68 Jahre). In 6 Fällen lag ein klinisches Stadium IAE vor. Zwei Patienten waren im klinischen Stadium IIAE und bei einem Patienten lag eine disseminierte Erkrankung im Stadium IV vor. Alle Gewebeproben wurden über Nacht in 4%iger gepufferter Formaldehydlösung bei pH 7,0 fixiert. Nach Paraffineinbettung wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Für die Lymphomdiagnose wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD20, CD5, CD23, CyclinD1, AE1/3 und Ki67 durchgeführt.

SHARP-Screening

Zur Analyse der bakteriellen Diversität in den untersuchten Gewebeproben wurde eine universelle Screeningmethode, der wir das Acronym SHARP (16S rDNA Heterogenitätsanalyse durch RFLP und Phylogenetik) gegeben haben, verwendet. SHARP-Screening ist ein zellkulturunabhängiges Werkzeug zur Analyse der mikrobiellen Besiedelung in chronischen Entzündungsprozessen. Es basiert auf der Analyse der unterschiedlichen Allele der bakteriellen 16S-ribosomalen RNA-Gene. 16S rRNA ist eine strukturelle Komponente der bakteriellen Ribosomen, die die Translation von Messenger-RNA in Aminosäuresequenzen zur Proteinbiosyn-

Abb. 1 **a** Extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome. Der Tumor weist häufig eine Ausbreitung in der Marginalzone bestehender Lymphfollikel auf (HE, Vergr.: 1:50). **b** Das Lymphom umwächst häufig residuelle Keimzentrumsstrukturen (*links unten*) und zerstört diese schließlich (HE, Vergr.: 1:200). **c** In der Proliferationsdarstellung wird das auf die Marginalzone akzentuierte Wachstum deutlicher erkennbar (Ki67, Vergr.: 1:50). **d** Gelegentlich ist eine Infiltration und Destruktion präexistenter Epithelien nachweisbar (sog. „lymphoepitheliale Läsion“, AE1/3, Vergr.: 1:400). **e, f** In einzelnen Fällen ist eine sekretorische Differenzierung mit „Ausreifung“ zu Plasmazellen nachweisbar, die eine monotypische Leichtkettenexpression als Ausdruck der Monoklonalität aufweisen (E kappa, F lambda, Vergr.: 1:400).

these durchführen. Im Laufe der Evolution ist die 16S rRNA hochkonserviert geblieben. Diese Tatsache unterstreicht die zentrale Rolle dieser Proteine in der Entwicklung und dem physiologischen Zellstoffwechsel der Bakterien. Die verschiedenen Bakterienstämme unterscheiden sich in der exakten Nukleotidsequenz des 16S-RNA-Gens.

Die in dieser Studie verwendete SHARP-Screening-Methode basiert prinzipiell auf der umfassenden Detektion aller in der jeweiligen Gewebeprobe enthaltenen 16S-rRNA-Gensequenzen und nachfolgender Identifikation der entsprechenden Bakterien durch Analyse der präzisen Basensequenzen. Technisch wird dies durch zwei komplementäre Schritte realisiert: Zunächst wird eine Genbank aller

bakteriellen 16S-rRNA-Gene, die in dem jeweiligen analysierten Gewebe enthalten sind, angelegt. In einem zweiten Schritt wird eine Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) durchgeführt, die eine Selektion der jeweiligen unterschiedlichen Phylotypen (Sequenzen) der enthaltenen 16S-rRNA-Gene erlaubt. Schließlich werden diese durch Sequenzierung und Vergleich mit bekannten bakteriellen Sequenzen identifiziert.

DNA-Extraktion und Konstruktion der 16S-rRNA-Genbank

Die in den untersuchten Gewebeproben enthaltene DNA wurde aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Ma-

terial aller 18 Fälle mit Hilfe des QIAamp DNAMini Kit (Qiagen) entsprechend der Anleitung extrahiert. Die isolierte DNA wurde unter Verwendung der universellen eubakteriellen Primer 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3') und 1492r (5'-TACGG(C/T)TACCTTGTACGAC TT-3') amplifiziert.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl 1xPCR reaction buffer (Qiagen) durchgeführt und enthielten 2 mM von jedem Primer, 0,2 mM dNTPs (Sigma) und 1U *Taq* Polymerase (Qiagen). Die verwendeten PCR-Bedingungen waren: Initiale Denaturierung (2 min bei 95°C), dann 30 Zyklen Denaturierung (1 min bei 95°C), Primer-Annealing (45 s bei 54°C) und Primer-Extension (1,5 min bei 72°C) und ein abschließender

Tab. 1 Übersicht über die in den jeweiligen Fällen nachgewiesenen bakteriellen 16S-rRNA-Phylotypen mit Identifikation des betreffenden Erregers und die Anzahl der identifizierten identischen Sequenzen

		BALT												fetal	fetal			
		1						2										
<i>α-proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>																	
<i>β-proteobacteria</i>	<i>β-proteobacteria</i>			1					1		1		1					
	AKIW733		3	2	5	1	2											
	<i>Achromobacter</i>	3	3		4		1											
	<i>Alcaligenes</i>	4	5	4	3	4	3	4	6									
	<i>Pandorea</i>								1		2		2	1	1			
	<i>Acidovorax</i>								3					1				
	<i>Variovax</i>									1	1		1	1	1			
	<i>Neisseria</i>										1							
<i>γ-proteobacteria</i>	<i>γ-proteobacteria</i>			1					2	2	2	1	1		2			
	<i>Stenotrophomonas</i>	2	2	3	1	3	3	1	4	3	4	4	3	4	2	1		
	<i>Pseudomonas</i>	3	1															
	<i>Acinetobacter</i>											1						
	<i>Escherichia</i>														2	2		
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus</i>								1		1	1		2	3			
<i>Actinomycetales</i>	<i>Rhodococcus</i>													1				
<i>Actinobacteria</i>	<i>Rubrobacter</i>												2					
	<i>Arthrobacter</i>										1				1			
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella</i>							3										
<i>Firmicutes</i>	<i>Granulicatella</i>								1									
	<i>Anoxybacillus</i>													1				
	<i>Streptococcus</i>									2	4							
	<i>Staphylococcus</i>		1															
Phylogenetisch nicht identifizierbar																		
	Sequenzen insgesamt	12	17	8	9	17	8	5	10	11	14	13	11	16	19	9	11	11

Extensionsschritt für 10 min bei 72°C. 1 µl der erhaltenen PCR-Produkte wurden als Template für eine anschließende nested PCR-Reaktion unter Verwendung der degenerierten eubakteriellen Primer 27f-b (5'-AG(A/G)GTT(C/T)GAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3') und 1406r-b(5'-ACGGGCGGTGTGT(A/G)C-3') eingesetzt. Die durchgeführten PCR-Reaktionen und Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie in der vorherigen PCR, mit der Ausnahme, dass 35 Zyklen durchlaufen, die Annealing-Temperatur auf 55° erhöht und die Primer-Verlängerungszeit auf 2 min verlängert wurde. Nach Aufreinigung mit dem QIAquick Gelextraktionskit (Qiagen) wurden 3 unabhängige PCR-Reaktionen kombiniert, um Amplifikationsfehler zu reduzieren und eine Ligation in einen pGEM-Teasy-Vector (Promega) nach Herstelleranweisung mit anschließender Transformation in *MnCl₂*-kompetente *Escherichia coli* Novablue durchgeführt.

RFLP-Analyse, Sequenzierung und phylogenetische Analyse

Insgesamt wurden von jeder Probe 48 Klone ausgewählt. Die Inserts wurden unter Benutzung der Plasmidprimer T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') und SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTA-TAGAATAC-3') reamplifiziert. Die PCR Aliquots (10 µl) wurden durch Einzerverdau mittels der Restriktionsendonukleasen *MspI* und *HaeIII* charakterisiert (vgl. **Abb. 2**). Klone mit identischen Restriktionsmustern wurden gruppiert und ein Klon aus jeder RFLP-Gruppe wurde zufällig für eine Plasmid-DNA-Isolation nach dem Standard-Miniprep-Verfahren ausgewählt. Die anschließende Sequenzierung wurde auf einem ABI377XL Automated Sequencer (Applied Biosystems) nach dem ABI-Prism-Sequenzierungsprotokoll durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem „ContigExpress Tool“ der Vector-NTI-Suite 6.0 editiert und unter Zuhilfenahme des Basic-Local-Alignment-Search-Tool- (BLAST-) Algorithmus mit bekannten Sequenzen in der NCBI-GenBank verglichen.

Pathologe 2008 · [Suppl 2] 29:290–296 DOI 10.1007/s00292-008-1068-1
© Springer Medizin Verlag 2008

P. Adam · C. Gernert · S. Schmitt · E. Haralambieva · G. Ott · H.K. Müller-Hermelink · U. Hentschel

Das Erregerspektrum pulmonaler MALT-Typ-Lymphome. Eine 16S-rRNA-basierte Analyse der mikrobiellen Diversität

Zusammenfassung

In extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen vom MALT-Typ (eMZBCL) wurde für verschiedene anatomische Lokalisationen eine Assoziation mit einer durch einen spezifischen Erreger verursachten chronischen Entzündung (z. B. *Helicobacter pylori* im Magen) beschrieben. Für die Lunge ist eine solche Erregerassoziation bislang nicht bekannt.

Mittels einer erstmalig auf diese Fragestellung angewandten sensitiven Screeningmethode (SHARP-Screening), die auf der Analyse der bakteriellen 16S-rRNA-Gene beruht, haben wir die mikrobielle Diversität von 9 eMZBCL der Lunge analysiert und mit 9 Kontrollfällen verglichen.

Interessanterweise konnten in 8 der 9 eMZBCL-Fälle Bakterien der *Alcaligenaceae*-Familie (*Alcaligenes*, *Achromobacter*, *AKIW733*) nachgewiesen werden, während keiner der 9 Kontrollfälle eine Besiedlung mit diesen Keimen zeigte. Weitere Untersuchungen, z. B. mit spezifischen PRC-Assays an größeren Fallzahlen sind nötig, um zu klären, ob Betaproteobakterien der *Alcaligenaceae*-Familie mit der Genese von eMZBCL in der Lunge assoziiert oder sogar ursächlich beteiligt sind.

Schlüsselwörter

Extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome · Lunge · Erreger · 16S rDNA

The spectrum of microbiological agents causing pulmonary MALT-type lymphomas. A 16S rRNA-based analysis of microbial diversity

Abstract

For several anatomical localisations of extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type (eMZBCL), an association with chronic inflammation caused by microbiological agents (e.g. *Helicobacter pylori* in the stomach) has been described. In the lung, a link between lymphomagenesis and a defined causative organism is still missing.

A comprehensive diversity survey using 16S-rDNA library construction followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, sequencing, and phylogenetic tree construction was employed for nine cases each of BALT lymphoma and control lung tissues (normal foetal lung, pneumonitis, carcinoid).

This highly sensitive method, hereafter termed SHARP screening allowed for identification of the entire bacterial population in the tissue in a cultivation-independent manner. It was noteworthy that

in eight of the nine cases of BALT lymphoma, bacteria of the *Alcaligenaceae* family (*Alcaligenes*, *Achromobacter*, *AKIW733*), were detected, whereas none of the control cases showed the presence of these clades.

16S-rDNA library construction in combination with RFLP screening and phylogenetic analyses, hereafter described as SHARP screening, is a cultivation-independent tool for analysing the microbial environment in chronic inflammation processes giving rise to extranodal marginal zone B-cell lymphomas of MALT-type. Betaproteobacteria of the *Alcaligenaceae* family may be affiliated with and possibly involved in the lymphomagenesis of BALT lymphomas.

Keywords

Extranodal marginal zone B-cell lymphoma · Lung · Microbiological agents · 16S rDNA

Abb. 2 ◀ Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) zur Selektion der jeweiligen unterschiedlichen Phlotypen (Sequenzen) der enthaltenen 16S-rRNA-Gene.

Phylogenetische Sequenzanalyse

Die aus dieser Studie erhaltenen Sequenzen wurden zusammen mit Referenzsequenzen mittels ClustalX [16] automatisch angeordnet und die entstandenen Anordnungen wurden anschließend manuell im windowsbasierten „Multicolor Sequence Alignment Editor Align“ (Heperle 2004) korrigiert. Die Konstruktion phylogenetischer Bäume erfolgte dann mit dem ARB-Software-Paket [13]. Als erster Schritt wurden sog. „neighbour-joining“ („Jukes-Cantor correction“) und „maximum parsimony trees“ mit den nahezu vollständigen Sequenzen (>1200 bp) und 100 Pseudoreplikaten berechnet. Als nächster Schritt wurden mittels des Parsimony-interactive-Tools Teilsequenzen zu den Bäumen hinzugefügt, ohne die Topologie zu verändern. Schließlich wurden sogenannte „50%-Majority Rule Consensus Trees“ konstruiert.

Ergebnisse

In den 18 untersuchten Fällen wurden 16S-rRNA-Sequenzen von 24 Bakterienspezies identifiziert. **Tab. 1** zeigt die in den jeweiligen Fällen nachgewiesenen bakteriellen 16S-rRNA-Phlotypen und die Anzahl der identifizierten identischen Sequenzen. Grundsätzlich war die mikrobielle Diversität in den Kontrollfällen deutlich breiter als in den Fällen mit eMZBCL. In 8 von 9 Fällen (89%) pulmonaler eMZBCL wurden Bakterien der *Alcaligenaceae*-Familie (*Alcaligenes*, *Acromobacter*, *AKAIW733*) identifiziert, während in keinem der Kontrollfälle diese Bakterienspezies nachgewiesen werden konnte. *Stenotrophomonas* wurde in allen Lun-

gengewebe nachgewiesen, außer dem eMZBCL-Fall, in dem auch Organismen der *Alcaligenaceae*-Familie nicht nachzuweisen waren, und einem Kontrollfall mit fetalem Lungengewebe.

◼ **Abb. 3** zeigt einen Überblick über die Taxonomie und die phylogenetische Verwandtschaft der Bakterien, die in dieser Studie mit pulmonalen eMZBCL assoziiert waren. Interessanterweise umfasst die Familie der *Alcaligenaceae*, deren Mitglieder in allen bis auf einen der Fälle mit pulmonalen eMZBCL nachzuweisen waren, auch die Gruppe *Bordetella* (z. B. *Bordetella pertussis*, den Erreger des Keuchhustens).

Diskussion

Extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome (eMZBCL) vom Typ des mukosaassoziierten lymphatischen Parenchyms (MALT) machen etwa 8% aller B-Zell-Lymphome aus [12]. Interessanterweise und im Gegensatz zu anderen Lymphomentitäten entstehen diese typischerweise nicht in Lymphknoten oder in Organen mit physiologischerweise angelegtem Lymphgewebe, sondern in anderen anatomischen Lokalisationen, die physiologischerweise kein MALT aufweisen (z. B. Magen, Speicheldrüse, Periorbitalregion, Haut, Lunge). Prinzipiell können sich eMZBCL vom MALT-Typ in jeder anatomischen Lokalisation manifestieren [1].

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass in den meisten Fällen der Manifestation eines eMZBCL die Entstehung eines erworbenen MALT vorausgeht. Diese Entstehung eines erworbenen MALT kann durch einen (chronischen)

Entzündungsprozess oder im Rahmen einer Autoimmunerkrankung geschehen. Für verschiedene anatomische Lokalisationen sind bereits assoziierte oder ursächliche Erreger für den chronischen Entzündungsprozess definiert worden. Das bekannteste Beispiel ist die Beobachtung einer Assoziation einer chronischen *Helicobacter-pylori*-Infektion mit der Genese eines gastralen eMZBCL [11]. Aber auch für eMZBCL in verschiedenen anderen anatomischen Lokalisationen wurde eine Assoziation mit definierten Infektionserregern beschrieben: In eMZBCL der Haut eine Assoziation mit *Borrelia burgdorferi* [4], in eMZBCL der Periorbitalregion mit *Chlamydia*, speziell mit *Chlamydia psittaci* [7], und in intestinalen eMZBCL mit *Campylobacter jejuni* [15]. Darüber hinaus wurde bezüglich der Infektionen mit *Chlamydia psittaci* unterschiedliche Infektionsraten, abhängig von der untersuchten geographischen Region, beschrieben [5]. Für die Lunge, eine der anatomischen Hauptlokalisationen eMZBCLs ist eine solche Assoziation zwischen der Lymphomgenese und einem definierten Infektionserreger bislang nicht bekannt.

Typischerweise sind die betreffenden Erreger nicht hochvirulent, sondern können durch das Immunsystem nicht effektiv eliminiert werden und unterhalten in der Folge eine lange andauernde chronische Entzündungsreaktion von niedriger Aktivität.

Auch 25 Jahre nach der ersten Beschreibung gastraler eMZBCL als eine distinkte Entität durch Isaacson und seine Arbeitsgruppe [10] ist die Identifikation spezifischer Krankheitserreger in den unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen von eMZBCL aufgrund des Fehlens einer mikrobiologischen Untersuchungsmethode, die an formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe durchführbar ist, schwierig.

Da die aktuelle Standardtherapie für eMZBCL heute in den meisten Fällen eine chirurgische Resektion nicht mehr beinhaltet, ist Frischgewebe nur selten verfügbar. Darüber hinaus kann eine Identifikation von Bakterien durch Anlage von Kulturen eine komplette Charakterisierung der gesamten Diversität in einem komplexen mikrobiologischen Umfeld nicht garantieren.

Abb. 3 ▲ Überblick über die Taxonomie und die phylogenetische Verwandtschaft der Bakterien, die in dieser Studie mit pulmonalen eMZBL assoziiert waren.

Die Verwendung des in dieser Studie eingesetzten SHARP-Screenings kann diese Schwierigkeiten überwinden, da diese Methode, im Gegensatz zu allen anderen verfügbaren Methoden (Kultur, bakterioskopische Färbung, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, PCR), das gesamte mikrobielle Spektrum, das in einer Gewebeprobe enthalten ist, unabhängig von

der Kultivierbarkeit der Bakterien erfasst und die Identifikation der einzelnen Bakterien sogar in einem komplexen mikrobiellen Umfeld erlaubt.

In verschiedenen Studien hat die Anwendung dieser Technik auf Umweltpflanzen eine bis dahin unbekannte mikrobielle Diversität aufgezeigt [9, 14], die über 99% des geschätzten gesamt bakteri-

ellen Gehalts eines Habitats umfasste [2]. Die Entdeckung dieses Volumens bislang nicht kultivierter Bakterienstämme in Umweltpflanzen wird als Meilenstein in der Umweltmikrobiologie angesehen [8].

In der vorliegenden Studie konnten wir die beschriebene Technik auf formalinfixiertes und paraffineingebettetes pathologisches Gewebe anwenden. SHARP-

Screening zeigte charakteristische Unterschiede in der mikrobiellen Diversität zwischen Patienten mit pulmonalem eMZBCL und anderen Lungenerkrankungen (vgl. **Tab. 1**): Während in den Gewebeproben der Patienten mit pulmonalem eMZBCL die Sequenzen von 11 verschiedenen Bakterienstämmen identifiziert werden konnten, zeigten die Vergleichsgewebe Sequenzen von 15 verschiedenen Stämmen. Diese Daten weisen auf eine deutlich breitere mikrobiologische Diversität in den Kontrollgeweben im Vergleich zu den Lymphomfällen hin.

Ursächlich für diesen Befund könnte teilweise die Auswahl von Infektionserkrankungen (eitrige Bronchopneumonien) als Kontrollfälle sein. Andererseits könnten sich aus diesem Screeningergebnis auch Hinweise auf das Vorhandensein eines spezifischen Infektionserregers in den Gewebeproben mit eMZBCL ergeben. Es wäre dann nicht ein breites Spektrum unspezifischer Erreger, sondern eine schmale Gruppe rekurrent nachweisbarer Infektionserreger, die den chronischen Entzündungsprozess unterhalten, vor dessen Hintergrund sich das Lymphom manifestiert.

Interessanterweise waren 8 von 9 untersuchten Fällen (89%) von pulmonalen eMZBCL durch einen oder mehrere Stämme der *Alcaligenaceae*-Familie (*Alcaligenes*, *Acromobacter*, AKAIW733) kolonisiert. In keinem der 9 Kontrollfälle konnten diese Bakterien nachgewiesen werden. Mitglieder dieser Familie, z. B. die Spezies *Acromobacter xylosoxydans* sind als seltene, aber relativ resistente opportunistische Krankheitserreger bekannt [3] und passen so in das Profil eines „typischen“ Infektionserregers, der mit der Pathogenese eines eMZBCL assoziiert ist. *A. xylosoxydans* konnte wiederholt aus dem Sputum von Patienten mit Mukoviszidose/zystischer Fibrose kultiviert werden. In einer aktuellen Studie [6] zeigten durch *A. xylosoxydans* kolonisierte Mukoviszidosepatienten eine ausgeprägtere Lungenschädigung und niedrigere Lungenfunktionswerte im Vergleich zu Kontrollpatienten. In Übereinstimmung mit den mit eMZBCL in anderer Lokalisation assoziierten Erregern ist *A. xylosoxydans* kein hochvirulentes Bakterium, verfügt

aber über eine ausgeprägte Resistenz gegen das Immunsystem.

Interessanterweise umfasst die *Achromobacter*-Familie auch die Spezies *Bordetella* (z. B. *Bordetella pertussis*, den Erreger des Keuchhustens, vgl. **Abb. 3**). Diese Tatsache könnte als weiterer Hinweis auf eine mögliche ursächliche Rolle von Bakterien dieser Familie in der Unterhaltung einer chronischen Entzündung gewertet werden, vor deren Hintergrund sich die Expansion eines eMZBCL abspielt.

In 2 der 3 Kontrollfälle mit fetalem Lungengewebe war im SHARP-Screening eine Kolonisierung mit *Escherichia spp.* nachweisbar, möglicherweise als Kontamination bei der Sektion.

Fazit für die Praxis

Das SHARP-Screening erweist sich als nützliche und geeignete Methode, um die bakteriologische Diversität auch in formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe zu erfassen. Mit dieser Methode ist es möglich, Infektionserreger, die mit chronischen Entzündungsprozessen assoziiert und möglicherweise an der Genese eMZBCLs beteiligt sind, zu identifizieren. Bakterien der *Achromobacter*-Familie könnten möglicherweise ursächlich an der Entstehung pulmonaler eMZBCLs beteiligt sein. Um die Frequenz einer Infektion mit diesen Erregern und die Relevanz für die Genese pulmonaler eMZBCLs zu evaluieren, sind weitergehende Untersuchungen an größeren Fallzahlen nötig.

Korrespondenzadresse

Dr. P. Adam
Institut für Pathologie,
Universitätsklinikum Würzburg
Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg
patrick.adam@med.uni-tuebingen.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Adam P, Haralambieva E, Ott G (2007) Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT-type. *Pathologie* 28: 6–14

2. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143–169
3. Arroyo JC, Jordan W, Lema MW et al. (1987) Diversity of plasmids in *achromobacter xylosoxydans* isolates responsible for a seemingly common-source nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* 25: 1952–1955
4. Cerroni L, Zochling N, Putz B et al. (1997) Infection by *borrelia burgdorferi* and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 24: 457–461
5. Chanudet E, Zhou Y, Bacon CM et al. (2006) *Chlamydia psittaci* is variably associated with ocular adnexal MALT lymphoma in different geographical regions. *J Pathol* 209: 344–351
6. De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S et al. (2007) *Achromobacter xylosoxydans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J Cyst Fibros* 6: 75–78
7. Ferreri AJ, Guidoboni M, Ponzone M et al. (2004) Evidence for an association between *chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphomas. *J Natl Cancer Inst* 96: 586–594
8. Hentschel U, Hopke J, Horn M et al. (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol* 68: 4431–4440
9. Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180: 4765–4774
10. Isaacson P, Wright DH (1983) Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 52: 1410–1416
11. Isaacson PG, Spencer J (1996) Gastric lymphoma and *helicobacter pylori*. *Important Adv Oncol*: 111–121
12. Jaffe ES HNL, Stein H, Vardiman JW (eds) (2001) World health organization classification of tumours. pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon
13. Ludwig W, Strunk O, Westram R et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32: 1363–1371
14. Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734–740
15. Parsonnet J, Isaacson PG (2004) Bacterial infection and malt lymphoma. *N Engl J Med* 350: 213–215
16. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F et al. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882