

Klinische Relevanz der Fadenpilzbesiedlung im Respirationstrakt von Patienten mit Zystischer Fibrose

Regine Horré^{1,2*}, Michaela Lackner^{1,3}, Elisabeth Müller², Günter Marklein^{2*}

* Die Autoren sind Mitglieder der ISHAM working group on „Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis“ (www.isham.org/pdf/Working-CF-WEB.pdf)

ISHAM^o: INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY

1. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn; 2. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Universitätsklinikum Bonn; 3. Institut für Mikrobiologie, Universität Innsbruck

Korrespondierender Autor: Dr. med. Regine Horré; Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3; 53175 Bonn E-Mail: regine.horre@gmx.de

Schlüsselwörter: Mukoviszidose, zystische Fibrose, Pilze, Respirationstrakt, Kolonisation, Infektion, allergisch-bronchopulmonale Mykose

Einleitung

Die Zystische Fibrose (CF, Mukoviszidose) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit Mutation des *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene (CFTR)*. Dieses Gen ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und kodiert einen Chloridkanal, der an dem Elektrolytaustausch durch die Plasmamembran beteiligt ist. Inzwischen kennt man eine Vielzahl von verschiedenen Mutationen, die mit unterschiedlichen Manifestationen, Krankheitsverläufen sowie Infektionsprädispositionen gekoppelt sind. Folglich reicht das klinische Spektrum der CF von sehr leichten bis schwersten Verlaufsformen. Heute sind rund 4 % der Menschen in Deutschland heterozygote Träger einer CFTR-Genmutation, also rund drei Millionen Menschen; etwa 8.000 Personen in Deutschland sind homozygote Träger und somit erkrankt. Jedes Jahr werden in Deutschland rund 300 Kinder mit Mukoviszidose geboren.

Die hierzulande häufigste Mutation ist die so genannte $\Delta F508$ Mutation, die bei homozygoten Trägern in der Regel einen raschen Krankheitsbeginn im ersten Lebensjahr mit zumeist ausgeprägter pulmonaler Beteiligung bedingt. Durch Defekte der mukoziliären Clearance und der Bildung von zähem Bronchialschleim entsteht ein Milieu, welches manchen Bakterien

optimale Wachstumsbedingungen bietet (z. B. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* und *Stenotrophomonas maltophilia*). Neben der asymptomatischen Besiedlung kommt es zu rezidivierenden Infektionen mit einer entsprechenden antimikrobiellen Chemotherapie. Dadurch wird die physiologische Mikroflora des oberen Respirationstrakts zunehmend zerstört und im weiteren Verlauf der Erkrankung durch Bakterien und Pilze mit steigender Antibiotika/Chemotherapeutika-Resistenz ersetzt. Neben *Candida*-Arten, insbesondere *C. albicans*, sind mehrere filamentöse Pilze sowie auch *Pneumocystis jirovecii* für eine klinische Progredienz verantwortlich zu machen. Bisher gibt es kaum umfassende wissenschaftliche Daten zum Vorkommen und zur Bedeutung filamentöser Pilze im oberen Respirationstrakt von CF Patienten. Die bislang vorliegenden Daten werden nachfolgend zusammenfassend dargestellt und resultieren im Wesentlichen aus den Erkenntnissen des ersten Treffens der ISHAM Arbeitsgruppe "*Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis*" am 7. und 8. Juni 2009 in Angers, Frankreich.

Surveillance und Behandlung

Erste Ergebnisse lieferten uni- oder multizentrische Studien zur Nachweisrate verschiedener Pilze aus dem oberen Respirationstrakt von CF Patienten aus Australien, Brasilien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Italien und Spanien. Sowohl die fokussierten Pilze als auch die verwendeten Methoden variieren deutlich innerhalb der einzelnen Untersuchungen, weshalb die Resultate nicht unmittelbar miteinander vergleichbar sind. Die Studiendauer umfasste 6 Monate bis 12 Jahre, wobei die Mehrzahl der Studien ein Beobachtungsintervall von 2 Jahren aufweist, manche werden jedoch noch fortgesetzt. Untersucht wurden zwischen 54 und 302 Erwachsene oder Kinder mit Zystischer Fibrose, von denen 208 bis 8552 respiratorische Proben, in der Regel Sputen untersucht wurden. Mit Nachweisraten von 11,1 % (Spanien) bis 81,0 % (Dänemark) erwies sich *Aspergillus fumigatus* bei allen Studien als häufigster Fadenpilz. Die Isolationsrate anderer *Aspergillus*-Arten war am höchsten für *A. flavus* (25,0 %) in Italien, jedoch deutlich geringer in allen anderen Studien (5,0 % in Dänemark, 2,4 % in England oder noch niedriger). Beim Vergleich der Nachweisraten bei Erwachsenen und Kindern in einer spanischen Studie wurde *A. fumigatus* häufiger bei Kindern, *A. flavus* häufiger bei Erwachsenen isoliert. Als weitere *Aspergillus*-Arten wurden *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans* und *A. versicolor* detektiert, alle mit Isolationsraten unter 5,0 %. Invasive Pilzinfektionen während des Studienverlaufs wurden nur in Italien analysiert: drei Patienten mit *A. fumigatus* und ein Patient mit *A. flavus*-Infektion wurden während des Studienintervalls diagnostiziert.

In manchen Untersuchungen wurden *in vitro* Resistenztestungen durchgeführt. Hierbei wiesen die *A. fumigatus*-Isolate eine verminderte Azolsensibilität auf; in Frankreich (10–15 %) und in Dänemark (~ 2,5 %). Der Vergleich der Azolresistenzrate bei Isolaten von Patienten mit und ohne CF in England zeigte jedoch keine Unterschiede.

Die Identifikation der Isolate der Sektion *Fumigati* basierte vorwiegend auf morphologischen Kriterien und der bis zum Jahr 2005 gültigen Taxonomie. Somit blieben die neu definierten Spezies aus diesem Komplex unberücksichtigt, z. B. *Aspergillus lentulus* (Neubeschreibung 2005) [Balajee *et al.*, 2005], die morphologisch sehr ähnlich ist wie *A. fumigatus*, aber eine erhöhte Resistenz gegenüber antimykotischen Substanzen aufweist. Im selben Jahr wurden die beiden neuen Arten *A. fumigati*affinis und *A. novofumigatus* [Hong *et al.*, 2005] in der Sektion *Fumigati* beschrieben und 2008 schließlich *A. turcosus* sowie drei neue *Neosartorya*-Arten [Hong *et al.*, 2008]. Die Differenzierung zwischen diesen Arten anhand morphologischer Kriterien ist schwierig oder sogar unmöglich. Für die Erhebung epidemiologischer Daten und die Bewertung der klinischen Relevanz bei CF Patienten ist jedoch eine eindeutige Identifizierung auf Speziesebene unerlässlich. Durch Unterschiede im Resistenzspektrum dieser Arten ist die Speziesdiagnostik zusätzlich für die Einleitung einer geeigneten kalkulierten antimykotischen Behandlung relevant, da einige dieser Arten resistent gegenüber Amphotericin B oder Azolen sind.

Bisher eher unbekannt Pilze bei CF Patienten

Scedosporium apiospermum sensu lato wurde bereits als häufigster Fadenpilz nach *A. fumigatus* aus dem oberen Respirationstrakt bei CF Patienten in Frankreich beschrieben [Pihet *et al.* 2009], wobei die klinische Relevanz dieser Befunde nicht bekannt war. Bei einigen Patienten schien die Besiedlung zwar chronisch, aber asymptomatisch zu verlaufen, während andere CF Patienten allergisch-bronchopulmonale Symptome entwickelten und wieder andere sogar lebensbedrohliche invasive Infektionen. Eine signifikante Assoziation zwischen dem Nachweis von *S. apiospermum* und klinisch auffälligen allergisch-bronchopulmonalen Symptomen wurde in einem französischen Zentrum nachgewiesen. Bei den meisten aktuell beendeten Studien wurde die Neuklassifizierung der Pilze des *Scedosporium*-Komplexes aufgrund neuer molekularer Analysen [Gilgado *et al.*, 2005, 2007, 2008] noch nicht berücksichtigt. Die Nachweisraten von Pilzen des *Pseudallescheria / Scedosporium* -Komplexes waren sehr unterschiedlich und werden mit 3,4 % von 201 Patienten in Frankreich, 9,0 % von 220 Patienten in Italien, 6,0 % von 302 Patienten in Spanien, 2,3 % von 129 dänischen Patienten, 11,9 % von 42 deutschen Patienten, 11,6 % von 69 Patienten in Australien und 5,8 % von 218 englischen Patienten angegeben. Bei den Studien mit hohen Nachweisraten wurde ein neues Selektivmedium (SceSel+-Agar) verwendet, wobei die Inkubationszeit auf 28-30 Tage ausgedehnt wurde. Die neu definierte Art *Scedosporium aurantiacum* war in Australien in 5,8 % der Fälle nachweisbar, ebenso wie *S. prolificans*. Letztere wurde in Deutschland ebenfalls, aber nur bei einem der 42 untersuchten Patienten gefunden (2,4%).

Andere seltene Fadenpilzarten wurden von einzelnen Arbeitsgruppen in unterschiedlicher Häufigkeit aus CF-Sputen isoliert, beispielsweise *Exophiala dermatitidis*, *Geosmithia argillacea*, aber auch der früher den Parasiten zugeordnete Pilz *Pneumocystis*

jirovecii. Primär fehlidentifiziert wurde *G. argillacea* als *Penicillium* oder *Paecilomyces*. Bei der *in vitro* Testung zeigte sich eine Resistenz gegenüber Voriconazol sowie oft auch gegen Itraconazol bei variabler Sensibilität gegenüber Amphotericin B und Posaconazol. Alle diese Isolate waren jedoch Caspofungin-sensibel.

Pathophysiologie

Als Folge einer respiratorischen *Aspergillus*-Besiedlung entwickeln manche Patienten eine allergisch-bronchopulmonale Aspergillose (ABPA). Dies ist auch eine nicht seltene Komplikation bei CF Patienten, mit einer Prävalenz von etwa 4,4 % in den USA [U.S. Cystic Fibrosis Foundation 2007]. Die Diagnose ist schwierig und erfordert die Berücksichtigung klinischer, radiologischer, biologischer sowie mykologischer Untersuchungsergebnisse. Eine ABPA resultiert aus einer Immunantwort auf das Vorhandensein der Aspergillen in den Atemwegssekreten. Hierbei spielen T_H2-Lymphozyten eine zentrale Rolle [Knutsen & Slavin, 1998]. Typisch ist der Nachweis eines erhöhten IgE-Spiegels speziell gegen *Aspergillus*-Antigene sowie das Vorkommen präzipitierender Antikörper. Diese Immunantwort triggert einen destruktiven Prozess in den Atemwegen, der mit einer signifikant erhöhten Morbidität einhergeht. In einer französischen Studie konnte eine ABPA bei 18 von 201 CF Patienten diagnostiziert werden (8,9 %), in einer anderen bei acht von 85 CF-Kindern (9,1 %). Bei diesen Kindern bestand eine signifikante Assoziation mit einer RhDNase-Therapie, Sensibilisierung gegen *Alternaria* und *Candida* sowie einem niedrigen Body Mass Index (BMI). Multifaktorielle Analysen ließen eine unabhängige Assoziation zwischen niedrigem BMI und ABPA erkennen. Außerdem wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen einer Langzeitbehandlung mit Azithromycin und einer *Aspergillus*-Besiedlung beobachtet. Letztere könnte bedingt sein durch einen inhibitorischen Effekt von Azithromycin sowohl auf die Rekrutierung als auch die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, die für die erste Linie der Infektabwehr gegen *Aspergillus* verantwortlich sind. Der enge Zusammenhang einer Kolonisation durch *S. apiospermum* mit der Entwicklung ABPA-artiger Symptome wurde ebenfalls in einer anderen französischen Studie nachgewiesen. Außerdem bestand bei ABPA-Patienten häufiger eine Besiedlung mit *P. aeruginosa* als bei ABPA-negativen CF Patienten. Behandlungen einer ABPA durch IgE-Blockade mittels Omalizumab wurden erfolgreich durchgeführt. Zur Klärung, ob Omalizumab eine bedeutsame zusätzliche Therapieoption zur Behandlung einer ABPA bei kortikosteroidabhängigen CF Patienten darstellen könnte, wurde eine randomisierte, plazebokontrollierte Doppelblindstudie in verschiedenen Regionen Europas und der USA initiiert.

Die Bildung mikrobieller Biofilme im Menschen ist von einigen Bakterien sowie von *Candida*-Arten bekannt. Die extrazelluläre Matrix (ECM) der Biofilme kann die Mikroorganismen vor einer Wirtsabwehr und vor dem Angriff antimikrobieller Substanzen schützen. Longitudinalstudien ergaben, dass *A. fumigatus* im Respirationstrakt von CF

Patienten über Jahre persistieren kann und im *In-vitro*-Zellkulturmodell ebenfalls in der Lage ist, Biofilmstrukturen auf Bronchialepithelzellen zu bilden. Eine Interaktion dieser ECM von *A. fumigatus* mit *Pseudomonas aeruginosa* konnte ebenfalls gezeigt werden. In einer Folgeuntersuchung sollen diese Interaktionen ebenfalls *in vivo* an *cftr*^{-/-} Mäusen, welche die Gegebenheiten bei CF Patienten simulieren, geprüft werden. In anderen Studien wurden der Einfluss der Melaninsynthese, Unterschiede bei der Interaktion zwischen verschiedenen Pilzen und dem Wirt sowie die Immunantwort und der hemmende Einfluss von Fluvastatin auf systemische und lokale Inflammationsreaktionen untersucht.

Epidemiologische Studien und Umgebungsuntersuchungen

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Methoden als Grundlage zur Erhebung epidemiologischer Daten am Patienten und in seiner Umgebung neu entwickelt. Hier sind besonders zu erwähnen eine „Solid-Phase Cytometry“, Genotypisierung durch die Analyse der Anzahl von „Variable Number Tandem Repeats“ (VNTR), „Multilocus Sequence Typing“ (MLST) und die „Surface Enhanced LASER Desorption Ionisation-Time-of-Flight“ (SELDI-TOF) Massenspektrometrie. Zum Nachweis von Pseudallescheriosen und Scedosporiosen wurden IgM- und IgG1 kappa-Leichtketten monoklonaler Antikörper (light chain monoclonal antibodies, MAbs) entwickelt; erste Daten aus entsprechenden Studien liegen bereits vor.

Zur Verbreitung von *Scedosporium*- und *Pseudallescheria*-Arten in der Umwelt wurden mehrere Studien durchgeführt, unter anderem in Australien, Deutschland, Israel, Italien und Thailand. Neben den vorwiegend nachweisbaren Arten *S. apiospermum* und *P. boydii* konnten auch *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *P. minutispora* und *S. prolificans* aus den Umweltproben isoliert werden. In Australien fand man eine hohe Prävalenz der Art *S. aurantiacum* in urbanen Regionen.

Biologische Diagnose

Zur Optimierung der mykologischen Diagnostik bei CF Patienten wurden unabhängig voneinander in verschiedenen Ländern einige neue Methoden entwickelt, beispielsweise die Verwendung spezifischer (semi-)selektiver Kulturmedien, serologische Nachweisverfahren sowie die Anwendung molekularer Identifikationstechniken. Serologisch konnte gezeigt werden, dass spezifisches gegen die rekombinanten *A. fumigatus*-Antigene Asp f1, f2, f3, f4 und f6 gerichtetes IgE als frühdiagnostisches Kriterium einer Sensibilisierung und einer ABPA geeignet ist, bevor klinische Symptome nachweisbar sind. Eine Sensitivität von 80 % bei ABPA Nachweis konnte für das rekombinante Antigen rAspf4 gezeigt werden.

Wie bei den vorherigen Themenaspekten sind die Ergebnisse nicht unmittelbar vergleichbar, führen aber zu deutlich höheren Nachweisraten von Pilzen als bisher angewendete Methoden.

Weitere bisher wenig erforschte Gebiete hinsichtlich der Bedeutung von Pilzen bei CF Patienten sind die Anwendung neuer diagnostischer Verfahren, Fragen zu möglichen Infektionsquellen (Umgebungsuntersuchungen), zu Pilz-Bakterien-Wirt-Interaktionen sowie zur Dosierung von Antiinfektiva bei CF Patienten. Offenbar besteht auch eine unterschiedliche Prädisposition für bestimmte mikrobielle Besiedlungen bei unterschiedlichen Mutationen des ‚*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*‘ (CFTR) Gens.

Diskussion

Derzeit existieren keine allgemein gültigen / anerkannten Richtlinien zur mykologischen Diagnostik bei CF Patienten. Die aktuelle Diagnostik ist völlig unzureichend. Die verbesserte Behandlung und damit Zunahme der Überlebensrate von CF Patienten führt zur Zunahme von Pilzbesiedlungen durch ‚neue‘ Pilze. Die Re-Klassifikation bekannter Pilze, z.B. von Aspergillen der Sektion *Fumigati*, des *Pseudallescheria/Scedosporium* Komplex, aber auch von *Candida* Arten, wie *C. glabrata* und *C. parapsilosis* erschwert die Diagnostik, da eine Differenzierung mit herkömmlichen Methoden in der Regel nicht möglich ist. Folgende primäre Maßnahmen sollten angestrebt werden:

1. Erarbeitung internationaler Richtlinien zur mykologischen Diagnostik bei CF Patienten
2. Aufnahme von Pilzen in bestehende Ringversuche zur mikrobiologischen Diagnostik bei CF Patienten
3. Initiierung multizentrischer nationaler und internationaler Studien unter einheitlichen Bedingungen
4. stärkere Einbeziehung klinischer Aspekte (z.B. ABPA) und der genauen Mutation des CFTR Gens
5. Intensivierung von Umgebungsuntersuchungen und Typisierung von Isolaten
6. Intensivierung der Grundlagenforschung (Biofilmproduktion; Wirt-Pilz-Bakterien-Interaktion, etc.)

In mehreren Ländern gibt es bereits klare Konzepte und nationale Register hierzu. Auch in Deutschland sollten entsprechende Untersuchungen durchgeführt und möglichst zentral ausgewertet und registriert werden. Die Methoden und die Untersuchungsergebnisse sollten außerdem mit denen anderer Länder vergleichbar sein.

Literatur

Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2005;**4**: 625-632.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4930-4942.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 766-771.

Gilgado F, Gené J, Cano J, Guarro J. Reclassification of *Graphium tectonae* as *Parascedosporium tectonae* gen. nov., comb. nov., *Pseudallescheria africana* as *Petriellopsis africana* gen. nov., comb. nov. and *Pseudallescheria fimeti* as *Lophotrichus fimeti* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; **57**: 2171-2178.

Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 2005; **97**: 1316–1329.

Hong SB, Shin HD, Hong JB, et al. New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2008; **93**:87-98.

Knutsen AC, Slavin RG. Cell mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Immunol Allerg Clin North America* 1998; **18**: 25.

Pihet M, Carrère J, Cimon B, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis-a review. *Med Mycol* 2009; **47**: 387-397.

U.S. Cystic Fibrosis Foundation. Patient, 2006 Annual Data Report to the Center Directors 2007: Bethesda, MD
(<http://www.cff.org/LivingWithCF/QualityImprovement/PatientRegistryReport/>)

Die einzelnen Beiträge während der Tagung der *ISHAM working group on „Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis“* im Juni 2009 in Angers, Frankreich, können unter <http://www.isham.org/WorkingGroups/CysticFibrosis/doc.html> eingesehen werden.

Am Universitätsklinikum Bonn ist eine entsprechende Studie zum Vorkommen und zur klinischen Relevanz der Besiedlung mit Fadenpilzen geplant. Anfangs soll vorwiegend Pilzen der Gattungen *Exophiala*, *Pseudallescheria* und *Scedosporium* erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet werden und die Medien Erythritol-Chloramphenicol Agar (ECA) sowie ein *Scedosporium* Selektivmedium (SceSel+) zusätzlich zu den Routinemedien verwendet werden. Die Proben (in der Regel Sputen, keine Abstriche) werden zuerst ohne, dann mit Vorbehandlung des Mukolytikum Digest-EUR verarbeitet. Jede Kolonie der o.g. Pilze wird identifiziert, typisiert und konserviert (-70 °C). Gleiches erfolgt mit positiven Proben aus der Patientenumgebung (die Patienten entnehmen ggf. die Proben wie Blumenerde, Abstriche / Spülflüssigkeit der Inhalatoren etc. selbst). Neben den mikrobiologischen Daten werden klinische Daten gesammelt – einschließlich der Variation der Genmutation des CFTR Gens.

Das Mukolytikum Digest-EUR zur Probenvorbehandlung ist zu beziehen bei:

Eurobio Digest-EUR® ; LABORATOIRES EUROBIO ; 7, Avenue de Scandinavie
91953 Courtaboeuf ; Cedex B ; France ; Tél.: +33(0)1 69 07 94 77 ; Fax : +33(0)1690 7 9534;
e-mail: adv@eurobio.fr.

Die Herstellung des SceSel+ Mediums ist recht aufwendig. Das Medium kann nach Rücksprache bezogen werden bei Dr. Johannes Rainer; Institut für Mikrobiologie, Leopold Franzens University Innsbruck, Technikerstr. 25, A-6020 Innsbruck, Österreich, Tel: +43-(0)512-507-6024; Fax: +43-(0)512-507-2938; E-Mail: J.Rainer@uibk.ac.at.

Die Anleitung zur Herstellung ist beschrieben in:

Rainer J, Kaltseis J, de Hoog GS, Summerbell RC. Efficacy of a selective isolation procedure for species of the Pseudallescheria boydii complex. Antonie Van Leeuwenhoek 2008; 93: 315-322.

Die Herstellung des Erythritol-Chloramphenicol Agars ist beschrieben in:

De Hoog GS, Haase G. Nutritional physiology and selective isolation of Exophiala dermatitidis. Antonie Van Leeuwenhoek 1993; 64: 17–26.

Ein Protokollentwurf zur Probenverarbeitung ist beigelegt. Nehmen Sie bei Interesse bitte E-Mail Kontakt auf mit Dr. Regine Horré (regine.horre@gmx.de) oder Herrn PD Dr. Günter Marklein (marklein@mibi03.meb.uni-bonn.de).