

Therapie und Diagnostik systemischer Mykosen

Oft lebensbedrohlich und schwer zu erkennen

Bei schweren systemischen Mykosen ist die Identifizierung des Erregers für die Therapie wichtig, aber bislang schwierig. Die Massenspektrometrie zeigt Erfolg versprechende neue Wege auf.

Pilze sind in unserer Umwelt allgegenwärtig und kommen auch im Körper als zumeist harmlose Kommensalen häufig vor; einige Arten können jedoch schwere Infektionen verursachen. Obwohl im letzten Jahrzehnt mehrere hochwirksame Antimykotika zugelassen wurden, stellen systemische Mykosen nach wie vor eine akute Lebensbedrohung dar. Hier sind Intensivpatienten unter Behandlung mit Breitbandantibiotika, Krebskranke unter Chemotherapie, sowie Personen mit eingeschränkter Immunabwehr, zum Beispiel unter Immunsuppressiva bei Transplantationen oder durch HIV-Infektionen besonders gefährdet. Die Pilze gelan-

gen oft über die Lunge in den Blutkreislauf und von da in weitere Organe. Je nach Art des Erregers und Immunstatus des Patienten liegt die Letalität bei 15 bis weit über 50 Prozent. Am häufigsten werden invasive Mykosen durch Hefen der Gattung *Candida* ausgelöst, gefolgt von Schimmelpilzen (*Aspergillus*). Fadenpilze aus der Gruppe der *Dermatophyten* verursachen überwiegend Infektionen der Haut und der Nägel.

Antimykotika

Anders als bei bakteriellen Infektionen ist das Hauptproblem der Antimykotika-Behandlung nicht die Resistenzentwick-

lung, sondern die geringe therapeutische Breite der Medikamente bei systemischer Verabreichung. Sie kann neben der genauen Charakterisierung des Erregers regelmäßige Spiegelkontrollen erforderlich machen.

Vier Substanzklassen stehen zur Verfügung: Die Polyene leiten sich vom äußerst toxischen *Amphotericin B* ab; ihre Verträglichkeit wird in neueren Formulierungen durch eine Lipidhülle verbessert. Die größte Gruppe sind die Azole, die aufgrund ihrer chemischen Heterogenität erheblich im Wirkspektrum differieren. *Caspofungin* aus der Reihe der Echinocandine wird seit 2005 bei Candidiasis und Aspergillose eingesetzt,

Paradigmenwechsel im mykologischen Labor

Der Nachweis von Pilzinfektionen ist ein äußerst zeit- und arbeitsaufwendiges Prozedere im mikrobiologischen Routinelabor, das seit über 100 Jahren auf der Detektion aus Kulturmaterial basiert. Einige Pilze, insbesondere Dermatophyten, benötigen Inkubationen von mehreren Wochen. Andere Spezies wiederum lassen sich überhaupt nicht in den üblichen Medien anzüchten. Nach erfolgreicher Kultur ist die morphologische Begutachtung zur Speziesbestimmung die allgemein übliche Praxis. Sie setzt allerdings viel Erfahrung voraus.

Die 18S rRNA Sequenzierung zur Identifikation hat als ergänzende molekularbiologische Methode inzwischen in den Laboren Einzug gehalten, um in nicht eindeutigen Fällen eine Entscheidung zu treffen. Prinzipiell ist die molekulare Diagnostik zur Identifizierung von Pilzen sinnvoll und ermöglicht eine eindeutige Bestimmung der Spezies und damit eine Einschätzung der Sensitivität gegenüber Antimykotika.

Abbott hat eine neue Technologie entwickelt, die die Detektion und Bestimmung von Hefe- und Schimmelpilzen direkt aus der Probe, auch die Auflösung von Mischungen, in nur sechs Stunden erlaubt. Dadurch können Pilze kulturunabhängig in deutlich kürzerer Zeit als

bisher nachgewiesen werden. Diese PLEX-ID-Technologie basiert auf einer Kombination aus Breitspektrum-PCR und Elektrospray-Ionisierungsmassenspektrometrie. Je nach Wahl des Tests können damit Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen direkt aus dem Probenmaterial identifiziert werden. Der Broad Fungal Assay deckt in der nicht-diagnostischen Variante über 3.000 Spezies ab, die aus einer einzigen Probe detektiert werden können. Die diagnostische Variante (*Broad Fungal Spectrum*), die auch ein Extraktionskit für Bronchoalveoläre Lavage beinhaltet, ist voraussichtlich ab Juli 2012 verfügbar.



IB001EU2012

Abbott
A Promise for Life

Kontaktinformation

Dr. Michael De Graaff • Abbott Ibis Biosciences • michael.degraaff@abbott.com • www.ibisbiosciences.com

Flucytosin fast ausschließlich bei der Kryptokokkose von AIDS-Patienten.

Bei begründetem Verdacht auf eine Pilzerkrankung wird das Untersuchungsmaterial (Abstriche, Sputum, Drainagesekret, Biopsie, Nägel) in einem ersten Schritt mikroskopisch untersucht. Um Pilzhyphen bzw. Hefezellen sichtbar zu machen, muss das Material häufig mit speziellen Färbezusätzen vorbehandelt werden. Erkennt man typische Pilzstrukturen wie die fadenförmigen Pilzhyphen, so ist der Verdacht auf eine Mykose bestätigt. Zur Abklärung, um welchen Erreger es sich genau handelt, folgt die Kultivierung des Pilzes. Dabei können wertvolle Tage bis Wochen verstreichen, was besonders schwer wiegt, weil die Therapie umso Erfolg versprechender ist, je früher sie einsetzt.

Aufwendige Diagnostik

Die Identifikation des Erregers bereitet oft Schwierigkeiten, da je nach Spezies nur bestimmte temperatur- und nährmedienabhängige Wachstums- und Fruchtstadien des Pilzes zur Differenzierung geeignet sind. Zudem reicht die Sensitivität der verschiedenen Mikroskopie-, Kultur- und Färbetechniken zum frühzeitigen und eindeutigen Nachweis oft nicht aus. Deshalb werden – wenn verfügbar – zusätzlich serologische Verfahren eingesetzt, zum Beispiel der Galactomannan-Nachweis, eine sensitive ELISA-Technik zur Identifikation invasiver Aspergillosen (Galactomannan ist ein Glykoprotein der Zellwand von *Aspergillus*-Spezies).

Ähnlich empfindlich wie ELISA-Techniken – und damit deutlich sensibler als Kulturtechniken – ist die PCR. Allerdings muss die Auswahl der Zielsequenzen mit Bedacht erfolgen, da es aufgrund von Homologien zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann. Der wesentliche Vorteil der PCR ist die rasche Verfügbarkeit der Ergebnisse, ein Nachteil die mangelnde Vergleichbarkeit kommerzieller Kits.

Eine wertvolle molekularbiologische Methode speziell für den *Candida*-Nachweis ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), bei der die Erreger unter dem Mikroskop aufleuchten. Für die häufigsten Vertreter wie *C. albicans* und *glabrata* sind spezifische Tests erhältlich. Auch diese sensitive Technik ermöglicht eine genaue Bestimmung der Spezies innerhalb von nur wenigen Stunden.

Vereinzelte bildgebende Verfahren in Kombination mit diesen molekularbiologischen Techniken nützlich sein, um Organmykosen zu lokalisieren. Ein Aspergillom erscheint im CT zum Beispiel als mehr oder weniger typischer Rundherd.

Massenspektrometrie

Seit einiger Zeit bereichert ein weiterer Ansatz die molekulare Diagnostik: Die massenspektrometrische Analyse spezifischer Pilzproteine bzw. -nukleinsäuren charakterisiert Moleküle aufgrund ihrer Größe und Ladung. Die erzeugten Massenspektren sind ein „molekularer Fingerabdruck“ für die jeweilige Pilzspezies.

Seit kurzem kann die ESI-TOF¹-Massenspektrometrie zur Detektion zahlreicher Pilze, Viren und Bakterien eingesetzt werden. Dazu wird die DNA zunächst extrahiert und ein spezifisches Fragment durch PCR amplifiziert. Die anschließende Identifizierung erfolgt auf der Basis von DNA-Profilen mit anschließendem Datenbankabgleich (siehe Informationskasten zum PLEX-ID-Analyzer links).

¹Electrospray Ionisation Time of Flight



Dr. Dr. Anton Hartinger

Städt. Klinikum München, MEDIZET
anton.hartinger@klinikum-muenchen.de

18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology

June 11-15, 2012 | ISHAM
Berlin, Germany

>> From Laboratory to Clinic <<



Congress Chairman:
Prof. Dr. Markus Ruhnke
Charité Campus Mitte Berlin

More than 70 sessions related to the following General Scientific Topics:

- Biochemistry
- Virulence and pathogenicity
- Functional genomics
- Immunology
- Antifungals
- Veterinary Mycology
- Epidemiology
- Diagnosis
- Clinical Mycology
- Host fungus interactions
- Cell biology
- Molecular biology
- Genetics
- Resistance
- Public Health
- Taxonomy
- Therapy

See you in Berlin!

In cooperation with the German-speaking Mycological Society and the Mycosis Study Group



Full Program and further information:

www.isham2012.org