

Projekttitle: Identifikation von Pilzen in CF-Lungengewebe durch die Entwicklung eines molekularbiologischen Tests

Beteiligte

Wissenschaftler: PD. Dr. Volker Rickerts, Dr. K.Tintelnot, Robert Koch-Institut Berlin und Prof.Dr. Elisabeth Presterl, Universitätskrankenhaus Wien

Projektnummer: 1208

Laufzeit: Mai 2012 – Oktober 2014

Datum

Projektabschluss: April 2015

Fördervolumen: 19.744 €

Ziel des Projekts: Ziele: Die Innovation des Projekts liegt im Aufbau einer Diagnostik zum Scedosporium Nachweis. Scedosporium ist ein Pilz, von dem man vermutet, dass er für eine beobachtete ABPA¹-Symptomatik verantwortlich ist, in Proben aber nicht nachgewiesen wird. Das liegt daran, dass in Kultur-basierten Methoden der Pilz Scedosporium von einem anderen Pilz (Aspergillus fumigatus) oft überwachsen wird und daher diagnostisch „übersehen“ wird. Die 'allergische bronchopulmonale Aspergillose' ABPA könnte nach den neuesten Befunden daher auch eine „allergische bronchopulmonale Scedosporiose“ sein. Zudem verursacht der Erreger invasive Infektionen nach Lungentransplantation die ohne schnellen Erregernachweis tödlich verlaufen können.

Eine zuverlässige Scedosporium Diagnostik für die klinische Versorgung steht bislang nicht zur Verfügung. Diese Diagnose-Lücke möchten die Antragsteller durch die Entwicklung kulturunabhängiger molekularbiologischer Methoden nun schließen. Es ist geplant, molekularbiologische Methoden zu entwickeln und zu validieren, mit denen invasive Pilzinfektionen bei CF-Patienten detektiert und die verursachenden Pilze identifiziert werden können. Eine Unterscheidung zwischen klinisch relevanten Spezies von Aspergillus, Candida und Scedosporium soll damit möglich sein.

Bislang wird eine invasive Pilzinfektion histopathologisch (d. h. durch Färbung von Gewebe) untersucht, dabei kann aber nicht geklärt werden, durch welchen Pilz die beobachtete invasive Infektion verursacht wird. Will man den Pilz identifizieren, so kann eine Pilzkultur angelegt werden, was jedoch kein Ergebnis hinsichtlich einer Aussage gibt, ob der kultivierte Pilz die Lunge „nur“ besiedelt oder ob dieser auch eine Infektion macht. Hinzu kommt die Problematik, dass ein klinisch weniger relevanter Pilz den krankmachenden Pilz in der Kultur überwächst und zu einer Fehlinterpretation führt.

Methodik: Die Antragsteller möchten durch die Entwicklung einer Kombination zweier molekularbiologischer Methoden die CF-Pilzdiagnostik verbessern. Diese zu entwickelnde Pilz-Diagnostik ist kulturunabhängig und kombiniert zwei verschiedene Methoden:

- 1.) Die FISH-Technologie funktioniert über fluoreszenzmarkierte Sonden, die das Vorhandensein und die Lokalisation von Pilzen in Gewebeproben anzeigen können.
- 2.) Parallel wird durch Gensequenz-Analysen (PCR) eine Identifikation des entsprechenden Pilzes und eine Validierung des „FISH-Ergebnisses“ durchgeführt.

Die Kombination dieser molekularbiologischen Methode und eine „Eichung“ der Ergebnisse (Detektionssignale) anhand der Korrelation mit klinischen Daten (Proben von CF-Patienten mit nachgewiesener Pilz-Infektion werden verwendet) soll es ermöglichen, eine neue Methode zu entwickeln, die eine Aussage über invasive Pilzinfektionen in der CF-Lunge erlauben soll.

Diese neue Methode könnte dann für die Routine-Diagnostik genutzt und Therapieentscheidung erleichtern.

¹ allergische bronchopulmonale Aspergillose

Ausblick: Die Projektergebnisse geben Sequenz-Informationen zu Pilzen, die in der CF-Lunge eine Relevanz haben und zu Infektionen führen können. Anhand dieser Sequenz-Informationen sollen molekularbiologische diagnostische Tests entwickelt und validiert werden, die zur Detektion von Pilzinfektionen verwendet werden können. Diese molekularbiologische Pilzdiagnostik kann damit helfen, eine Therapieentscheidung (Soll der Pilz behandelt werden oder nicht?) zu treffen. CF-Patienten profitieren davon, da eine verbesserte Diagnostik eine schnelle und gezielte Therapie ermöglichen könnte, was insgesamt den Gesundheitszustand positiv beeinflussen sollte.

Ergebnisse:

In der Projektlaufzeit wurden für 7 Pilze der *Scedosporium*-Gruppe bestimmte Gensequenzen (18S und 28S-Gensequenzen) analysiert. Dabei wurde ein Bereich (im 18S Gen) entdeckt, der für alle der untersuchten *Scedosporium* Pilze gleich war, und deutlich von anderen Pilzen zu unterscheiden ist. Dieser für *Scedosporium* typische Bereich („konservierte Gensequenz“) ist daher geeignet, um Gen-Sonden (FISH-Sonden) zu entwickeln, die anzeigen, ob in pulmonalem Gewebe *Scedosporium* vorhanden ist oder nicht. Die in diesem Projekt entwickelten Gen-Sonden können nun zur Untersuchung von Gewebeproben eingesetzt werden, um eine Aussage treffen zu können, ob eine invasive Infektion vorliegt (d. h. der Pilz ist in das Gewebe eingedrungen) oder ob der Pilz „nur“ die Atemwege besiedelt. Die Lokalisation von *Scedosporium* im Gewebe mittels FISH könnte helfen die Rolle dieser Pilze als Ursache invasiver Infektionen oder als Ursache für Verschlechterungen der respiratorischen Funktion vor Lungentransplantation zu verstehen.