

# Studienprotokoll

## Fusarium-Infektionen und ihre Infektionsquellen im Innenraum

### Forschung an humanem Gewebe und Körperflüssigkeiten

Protokollversion:

Entwurfsversion vom 30.07.2024 /  
Finalversion 01 vom 09.08.2024

Vertraulichkeitshinweis:

Der Inhalt vom vorliegenden Studienprotokoll ist vertraulich zu behandeln und darf ohne Zustimmung vom Studienleiter weder mündlich noch schriftlich an Unbeteiligte weitergegeben werden.

## Inhaltsverzeichnis

1.	Allgemeine Informationen .....	3
2.	Fragestellung bzw. Hintergrund .....	4
3.	Studienziele .....	5
4.	Studiendesign und -beschreibung.....	5
4.1.	Art der Untersuchungsmaterialien.....	6
4.2.	Umfang der Materialien .....	6
4.3.	Herkunft des Materials .....	6
4.4.	Materialhandling.....	7
4.5.	Zeitplan .....	7
5.	Teilnehmende Einrichtungen.....	7
6.	Auswahl der Patienten/Probanden.....	7
6.1.	Information und Einwilligungserklärung.....	7
7.	Beschreibung der Labor- und anderen Untersuchungen und Methoden .....	8
8.	Biometrie .....	8
9.	Datenmanagement .....	8
10.	Datenschutz .....	8
11.	Ethische Belange, gesetzliche und administrative Regelungen.....	9
11.1.	Deklaration von Helsinki und Gute klinische Praxis.....	9
11.2.	Ethik-Kommissionen.....	9
11.3.	Nachträgliche Änderungen.....	9
11.4.	Gesetzliche Regelungen .....	9
11.5.	Finanzierung .....	9
11.6.	Abschlussbericht und Publikation .....	9
12.	Literatur.....	10
13.	Anlagen.....	10

# 1. Allgemeine Informationen

<b>Studienleiter</b> Name: Dr. Grit Walther Adresse: Adolf-Reichwein-Str. 23, 07745 Jena Tel.: 03641-532-1038 E-Mail: Grit.Walther@leibniz-hki.de	<b>Biometriker</b> Name: Umer Farooq Adresse: Albert-Einstein-Straße 10, 07745 Jena Tel.: 03641-532-1342 E-Mail: Umer.Farooq@leibniz-hki.de
<b>Stellvertreter des Studienleiters bzw. Mitglieder der Studienleitung</b> Name: Dr. Slavica Janevska Adresse: Albert-Einstein-Straße 10, 07745 Jena Tel.: 03641-532-1188 E-Mail: Slavica.Janevska@leibniz-hki.de	<b>Datenmanagement</b> Name: Juliane Rummelt Adresse: Adolf-Reichwein-Str. 23, 07745 Jena Tel.: 03641-532-1024 E-Mail: Juliane.Rummelt@leibniz-hki.de
<b>Labor/e</b> Labor: NRZMyk Adresse: Adolf-Reichwein-Str. 23, 07745 Jena Tel.: 03641-532-1038 E-Mail: nrzmyk@leibniz-hki.de	<b>Studienkoordination</b> Name: Dr. Enrico Garbe Adresse: Adolf-Reichwein-Str. 23, 07745 Jena Tel.: 03641-532-1232 E-Mail: Enrico.Garbe@leibniz-hki.de
<b>Referenzinstitute</b> Institut: Adresse: Tel.: E-Mail:	

## Unterschriften

---

Dr. Grit Walther, Studienleiter

Datum

---

Dr. Slavica Janevska, Stellvertreter des Studienleiter

Datum

---

Umer Farooq, Biometriker

Datum

---

Juliane Rummelt, Datenmanagement

Datum

---

Dr. Enrico Garbe, Studienkoordinator

Datum

## 2. Fragestellung bzw. Hintergrund

Das Nationale Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen (NRZMyk) unter der Leitung von Prof. Oliver Kurzai unterstützt Ärzte bei der Behandlung von Pilzinfektionen, in dem es Artbestimmungen liefert und Resistenztestungen durchführt. Die Forschung des NRZMyks berücksichtigt auch seltene Erreger-Pilze wie die der Gattung *Fusarium*, die eine oft schwer verlaufende Form der Keratitis verursachen und bei immunsupprimierten Patienten lebensbedrohliche systemische Infektionen hervorrufen können. Seit 2014 beschäftigt sich das NRZMyk mit der Epidemiologie, dem klinischen Erscheinungsbild und der Diagnostik von *Fusarium*-Keratitis. Die erste Studie im Zeitraum 2015-2020 (Ethik-Votum 4455-06/15) zeigte, dass es vor allem Arten des *Fusarium solani* Artkomplexes sind, die Keratitiden mit einem schweren Verlauf auslösen, während Vertreter des *Fusarium oxysporum* Artkomplexes einen milderen Verlauf zeigen oder möglicherweise nur Kontaminanten darstellen. Der wichtigste Risikofaktor für eine *Fusarium*-Keratitis in Deutschland ist das Tragen weicher Kontaktlinsen. Durch die 1. Studie wurden die wichtigsten Erregerarten und ihre in vitro-Resistenzprofile ermittelt (Walther et al. 2017, Roth et al. 2019, Roth et al. 2021, Walther et al. 2021). Offen blieben jedoch Fragen, die für die Prophylaxe und die Risikobewertung von *Fusarium*-Infektionen von entscheidender Bedeutung sind: wo infizieren sich die Patienten, welche Reservoirs werden von einzelnen *Fusarium*-Arten im Innenraum besiedelt, gibt es besonders virulente Stämme innerhalb der Arten und was ist die molekulare Basis der erhöhten Virulenz? Das vom Freistaat Thüringen finanzierte Projekt „*Fusarium*-Infektionen: Molekularbiologie und Diagnostik eines unterschätzten Erregers (FusInfect)“ möchte diese Fragen in den nächsten Jahren beantworten, indem es die Biodiversität der *Fusarium*-Arten im Innenraum und in

klinischen Proben erfasst, die Hauptreservoirs der klinisch bedeutsamen Arten ermittelt, Erregerstämme anhand des klinischen Verlaufs der Infektion kategorisiert und auf Genotyp- und Genom-Ebene vergleicht. Für ein besseres Verständnis der molekularen Basis von Virulenz in *Fusarium* untersucht das FusInfect-Projekt neben Keratitis-Erregern auch Erreger systemischer Fusariosen. Eine zentrale Frage ist die Bedeutung akzessorischer Chromosomen im *Fusarium oxysporum* Artkomplex als Virulenzfaktoren.

### 3. Studienziele

Das Hauptziel der Studie ist die Aufdeckung der **Hauptreservoirs pathogener *Fusarium*-Arten** im Innenraum und Patientenmaterialien und damit auch der potentiellen Infektionswege. Anhand dieser Erkenntnisse sollen Maßnahmen für eine verbesserte Prophylaxe von *Fusarium*-Keratitis formuliert werden.

Ein weiteres Hauptziel der Studie ist die **Charakterisierung von Virulenzfaktoren** von *Fusarium*-Arten, was die Einschätzung von leichten und schweren Verläufen der Infektion und damit die Kenntnis des Krankheits- und Therapieverlaufs voraussetzt. Durch Genom-Analysen von Erregerstämmen derselben Art von leichten und schweren Verläufen möchten wir Virulenzfaktoren erkennen. Innerhalb des *Fusarium oxysporum* Spezieskomplex (FOSC) steht dabei die Bedeutung akzessorischer Chromosomen als Träger von Virulenzfaktoren im Vordergrund.

Ein Nebenziel der Studie ist die **Analyse von Therapie-Erfolgen in Abhängigkeit vom verwendeten Antimykotikum und der Erreger-Art** bei systemischen Infektionen.

### 4. Studiendesign und -beschreibung

Durch den Eingang von *Fusarium*-Isolaten erfährt das NRZMyk von *Fusarium*-Infektionen (Keratitis, Blutstrominfektionen) in ganz Deutschland. Auf Basis dieser Informationen werden die behandelnden Ärzte kontaktiert. Diese unterrichten die Patienten mit Hilfe des Aufklärungsbogen über die Studie, bitten um Mithilfe und händigen den Patienten ein Original Exemplar der Patienteninformation und der Einverständniserklärung inklusive Schweigepflichtentbindung aus.

Bei positiver Rückmeldung durch eine Patientin / einen Patienten an das NRZMyk und dem schriftlichen Vorliegen einer Einverständniserklärung werden:

- die behandelnden Ärzte durch Mitarbeiter des NRZMyk zu klinischen Daten wie Ursache der Infektion, Risikofaktoren, Verlauf und Behandlung befragt und die gewonnenen Informationen dokumentiert.
- bei entsprechender Einwilligung Materialien wie Kontaktlinsen und Kontaktlinsen-Reinigungsflüssigkeit soweit noch vorhanden und nicht für die Primärdiagnostik benötigt, ans NRZMyk gesendet und mittels kulturellem und molekularem Erregernachweis auf das Vorhandensein von Fusarien untersucht.
- bei entsprechender Einwilligung die Patienten von Mitarbeitern des NRZMyk kontaktiert und befragt (s. Dokumentationsbögen I und II).
- **nur bei Keratitis-Patienten** (da hier Infektion im häuslichen Umfeld wahrscheinlich): bei entsprechender Einwilligung die Wohnungen der Patienten auf Vorhandensein von Fusarien untersucht. Dazu werden aus dem Bad der betroffenen Patienten sowohl Raumluft- als auch Materialproben von Oberflächen wie Wänden, Duschverkleidungen, Duschköpfen, Wasserhähnen, Abläufen, Silikonfugen, etc.

entnommen, um den Erreger kulturell nachzuweisen. Insgesamt werden eine Raumlufprobe (Fangplatte), eine Wasserprobe und je nach Raumgröße bis zu 16 Materialproben mittels steriler Tupfer von definierten Stellen im Bad entnommen. Die Tupfer werden direkt auf ein Selektivmedium (Nash-Snyder-Medium) ausgestrichen und mindestens 2 Wochen bei Raumtemperatur kultiviert. Auswachsende Myzelien mit Fusarium-Morphologie werden in Reinkultur gebracht und anschließend molekular identifiziert. Nach Abschluss der Untersuchung erhalten die Patienten einen Bericht mit einer Liste der nachgewiesenen Arten und, soweit möglich, Handlungsempfehlungen zu deren Entfernung. Wir gehen davon aus, dass die Zahl der Patienten, die sich dazu bereiterklären, gering ist. Wir streben 20 Wohnungsbehebungen an.

Ausgehend von der Zahl der in den letzten 5 Jahren durch das NRZMyk dokumentierten Fälle von Keratitiden und Blutstrominfektionen durch Fusarium rechnen wir mit ca. 24 Fällen von Keratitis und 4 Blutstrominfektionen pro Jahr. Da wir davon ausgehen, dass nur ein kleiner Teil der Patienten dieser Untersuchung zustimmt, liegt unser Ziel bei 20 Wohnungsbehebungen einschließlich Falldokumentationen. Bei den Blutstrominfektionen möchten wir insgesamt ebenfalls 20 Fälle detailliert dokumentieren.

Basierend auf den Daten zu Verlauf und Therapie der Infektion (z.B. Dauer der Behandlung, Therapien, Rezidive, Notwendigkeit von Keratoplastiken oder E nukleationen) werden die Fälle kategorisiert. Durch die PCR (Vorhandensein akzessorischer Chromosomen) und/oder Genom-basierte Analyse der zu den Fällen gehörenden Isolate erhoffen wir uns Rückschlüsse auf molekulare Ursachen von Virulenzunterschieden. Aus der Analyse der Daten zu systemischen Fusariosen möchten wir entnehmen, was die wichtigsten Risikofaktoren für Fusariosen in Deutschland sind, und ob sich die Erreger-Arten in ihrem Ansprechen auf bestimmte Antimykotika unterscheiden.

#### **4.1. Art der Untersuchungsmaterialien**

Die Untersuchung von humanem Material wie Hornhautabradat, Kammerwasser, Glaskörperflüssigkeit und Blut zum molekularen Nachweis von Erregern erfolgt innerhalb der Standard-Diagnostik des NRZMyk. Für die Studie werden zudem Keratitis-assoziierte Materialien wie Kontaktlinsen und Kontaktlinsen-Reinigungsflüssigkeiten sowie Innenraumproben untersucht.

#### **4.2. Umfang der Materialien**

Wir haben bisher noch keine derartige Studie durchgeführt, gehen aber davon aus, dass uns in weniger als 20% der Fälle die Kontaktlinsen oder deren Reinigungsflüssigkeit zur Verfügung gestellt werden, sodass wir mit Material in ca. 24 Fällen im Verlauf der 5jährigen Studiendauer rechnen.

#### **4.3. Herkunft des Materials**

Bei dem ausschließlich aus Studiengründen untersuchten Material handelt es sich um nicht humanes Material. Humanes Material wie Blut, Hornhaut, etc. wird innerhalb der NRZMyk-Diagnostik bearbeitet.

#### 4.4. Materialhandling

**Kontaktlinsen** werden zunächst geteilt. Von einem Teil wird versucht, den Erreger zu kultivieren. Vom zweiten Teil wird DNA extrahiert und mit einer anschließenden Nested PCR der Erreger auf Artebene oder Artkomplexebene bestimmt (Walther et al. 2021).

**Kontaktlinsen-Reinigungsflüssigkeit** wird zentrifugiert und im Anschluss unter sterilen Bedingungen dekantiert. Ein Teil der Restflüssigkeit wird auch hier verwendet, um den Erreger zu isolieren. Aus dem anderen Teil wird ebenfalls DNA extrahiert, um den Erreger molekular nachzuweisen.

Die Tupfer der **Innenraum-Materialproben** werden noch vor Ort auf Nash-Snyder-Platten, einem semiselektiven Medium für *Fusarium* spp. ausgestrichen und mindestens 2 Wochen bei Raumtemperatur inkubiert. Auswachsene Myzelien werden mikroskopiert. Myzelien mit charakteristischer *Fusarium*-Morphologie werden in Reinkultur gebracht und molekular identifiziert.

#### 4.5. Zeitplan

Die erwartete Gesamtstudiendauer beträgt 5 Jahre.

### 5. Teilnehmende Einrichtungen

Name, Vorname, Titel:	Prof. Oliver Kurzai (Leiter) Dr. Grit Walther (Studienleitung)
Klinik/Institution:	Nationales Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen (NRZMyk), Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie (Leibniz-HKI)
Telefon-Nummer:	0931 31-46160
E-Mail:	<a href="mailto:oliver.kurzai@leibniz-hki.de">oliver.kurzai@leibniz-hki.de</a>

### 6. Auswahl der Patienten/Probanden

Eingeschlossen werden unabhängig vom Geschlecht alle Patientinnen und Patienten mit lokalen *Fusarium*-Infektionen des Auges (Keratitis, Endophthalmitis) oder systemischen Infektionen, bei denen *Fusarium* im Blut nachgewiesen wurden und deren Proben am NRZMyk bearbeitet werden.

Kinder und Nicht-Einwilligungsfähige werden nicht in die Studie eingeschlossen.

#### 6.1. Information und Einwilligungserklärung

Patientenaufklärung und -einwilligung (s. Anlagen)

## 7. Beschreibung der Labor- und anderen Untersuchungen und Methoden

Für den **kulturellen Nachweis** von Fusarium-Arten sowohl von Kontaktlinsen und Kontaktlinsen-Reinigungsflüssigkeit als auch von Innenraumoberflächen wird das semiselektive Nash-Snyder-Medium (Hall et al. 1981) verwendet, auf dem Fusarium-Arten besser wachsen als die meisten anderen, im Innerraum häufigen Gattungen (z.B. Cladosporium, Penicillium). Die Nash-Snyder-Kulturplatten werden mindestens 2 Wochen bei Raumtemperatur inkubiert. Auswachsende Myzelien mit Fusarium-Mikromorphologie werden in Reinkultur gebracht und mittels Sequenzierung des Translationselongationsfaktors  $1\alpha$  molekular identifiziert (Walther et al. 2021).

Für den **molekularen Fusarium-Nachweis** von Kontaktlinsen und Kontaktlinsen-Reinigungsflüssigkeit wird die DNA mittels Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit extrahiert. Da diese Proben sehr wahrscheinlich nur geringe Mengen DNA enthalten, erfolgt zunächst eine panfungale Primär-PCR der gesamten ITS-Region. In der anschließenden Nested PCR wird der innere Teil der ITS Fusarium Artkomplex-spezifisch amplifiziert.

## 8. Biometrie

In den letzten fünf Jahren bearbeitete das NRZMyk durchschnittlich 24 Proben von Keratitis-Fällen und 4,2 Proben von Fusarium-Blutstrominfektionen pro Jahr. Wir rechnen damit, dass in von etwa einen Drittel der Fälle (insgesamt 40 Fälle) Kontaktlinsen- und/oder Kontaktlinsen-Reinigungsflüssigkeit untersuchen können. Wir gehen davon aus, dass nur ein kleiner Teil der Keratitis-Patienten der Untersuchung seines Bades zustimmt, weshalb unser Ziel bei 20 Wohnungsbeprobungen einschließlich Falldokumentationen liegt. Hierbei muss betont werden, dass der Erkenntnisgewinn trotz der kleinen Fallzahlen sehr hoch ist, da die direkte Untersuchung die einzige Möglichkeit ist, um die konkreten Infektionsquellen aufzudecken. Durch die Isolierung der Fusarium-Stämme ist später auch ein Genom-Vergleich zwischen klinischen und Umwelt-Isolaten möglich. Bei den Blutstrominfektionen möchten wir innerhalb der 5 Jahre insgesamt ebenfalls 20 Fälle detailliert dokumentieren. Da es sich um eine korrelative und deskriptive wissenschaftliche Studie handelt, entfällt eine Fallzahlkalkulation.

## 9. Datenmanagement

Das Datenmaterial entstammt Patientenakten (elektronisch und Papier), unmittelbaren Befragungen der Patienten und der behandelnden Ärzte sowie Untersuchungen des Wohnraums (Bäder) der Patienten. Die erhobenen klinischen Daten umfassen Symptome, Risikofaktoren, Grunderkrankungen, und Therapien. Die Daten werden auf standardisierten Dokumentationsbögen extrahiert (s. Anlagen. Dokumentationsbogen I und II) und anschließend in eine Datenbank übertragen. Die Dokumentationsbögen werden mindestens 10 Jahre aufbewahrt.

## 10. Datenschutz

Die Dokumentationsbögen sowie die Einträge in der Datenbank werden pseudonymisiert, sodass nur die an der Studie beteiligten und unter Punkt 1 gelisteten Personen die Dokumentationsbögen individuellen Patienten zuordnen können. Publikationen zu dieser Studie werden keine Daten enthalten, die Rückschlüsse auf Personen zulassen.



# **11. Ethische Belange, gesetzliche und administrative Regelungen**

## **11.1. Deklaration von Helsinki und Gute Klinische Praxis**

Die Studie wird gemäß den ethischen Grundsätzen durchgeführt, die ihren Ursprung in der Deklaration von Helsinki [Ref.] haben. Die jeweils aktuelle Version der Deklaration wird beachtet.

Die Empfehlungen der Guten Klinischen Praxis [Ref.], gültig seit dem 17.1.1997, werden, sofern zutreffend, berücksichtigt.

## **11.2. Ethik-Kommissionen**

Das Studienprotokoll wird mit den erforderlichen weiteren Unterlagen der zuständigen Ethik-Kommission des Studienleiters mit der Bitte um Bewertung vorgelegt. Die Studie kann erst nach zustimmender Bewertung der Ethik-Kommission beginnen.

## **11.3. Nachträgliche Änderungen**

Änderungen oder Ergänzungen des Studienprotokolls können nur vom Studienleiter veranlasst und autorisiert werden. Über Änderungen des Studienprotokolls wird die Ethik-Kommission informiert. Ggf. wird erneut die zustimmende Bewertung eingeholt. Bewertungspflichtige Änderungen dürfen nicht vor der Entscheidung der Ethik-Kommission umgesetzt werden.

Änderungen der von der Ethik-Kommission zustimmend bewerteten Studie sind:

- Auswirkungen auf die Sicherheit der betroffenen Personen,
- zusätzliche Datenerhebungen oder Auswertungen, die eine Änderung der Patienteninformation und/oder -einwilligung erfordern,
- die Auslegung der wissenschaftlichen Dokumente, auf die die Studie gestützt wird, oder die wissenschaftliche Aussagekraft der Studienergebnisse zu beeinflussen,
- die Art der Leitung oder Durchführung der Studie wesentlich zu verändern.

## **11.4. Gesetzliche Regelungen**

Infektionsschutzgesetz

## **11.5. Finanzierung**

Die Studie erfolgt im Rahmen des FusInfect-Projektes, das vom Freistaat Thüringen (Thüringer Aufbaubank) mit Mitteln aus dem Europäischen Sozialfonds Plus (ESF) unterstützt wird.

## **11.6. Abschlussbericht und Publikation**

Die Veröffentlichung der Studienergebnisse erfolgt unabhängig davon, wie die Ergebnisse ausfallen.

Eine Kopie des Abschlussberichtes / der Publikation ist der Ethik-Kommission vorzulegen.

## 12. Literatur

Walther G, Stasch S, Kaerger K, Hamprecht A, Roth M, Cornely OA, Geerling G, Mackenzie CR, Kurzai O, von Lilienfeld-Toal M (2017) Fusarium Keratitis in Germany. *J Clin Microbiol* 55(10), 2983-2995. doi: 10.1128/JCM.00649-17.

Roth M, Daas L, Renner-Wilde A, Cvetkova-Fischer N, Saeger M, Herwig-Carl M, Matthaei M, Fekete A, Kakkassery V, Walther G, von Lilienfeld-Toal M, Mertens C, Lenk J, Mehlan J, Fischer C, Fuest M, Kroll S, Bayoudh W, Viestenz A, Frings A, MacKenzie CR, Messmer EM, Seitz B, Kurzai O, Geerling G (2019) Das Deutsche Pilz-Keratitis-Register: Erste Ergebnisse einer multizentrischen Erhebung [The german keratomycosis registry: Initial results of a multicenter survey]. *Ophthalmologie* 116(10), 957-966. doi: 10.1007/s00347-019-0871-9.

Roth M, Holtmann C, Daas L, Kakkassery V, Kurzai O, Geerling G, Baurle S, Bayoudh W, Brucher V, Cvetkova-Fischer N, Dias Blak M, Bornstein A, Fischer C, Fuest M, Grisanti S, Herwig-Carl M, Kroll S, Lenk J, Lommatzsch C, MacKenzie C, Matthaei M, Mehlan J, Messmer E, Müller V, Pawlik V, Ranjbar M, Renner-Wilde A, Rickmann A, Saeger M, Schargus M, Schwarz L, Seitz B, Steindor F, Unterlauf JD, Viestenz A, von Lilienfeld-Toal M, Walther G (2021) Results from the German fungal keratitis registry: Significant differences between cases with and without a history of contact lens use. *Cornea* 40(11), 1453-1461.

Walther G, Zimmermann A, Theuersbacher J, Kaerger K, von Lilienfeld-Toal M, Roth M, Kampik D, Geerling G, Kurzai O (2021) Eye infections caused by filamentous fungi: Spectrum and antifungal susceptibility of the prevailing agents in Germany. *J Fungi (Basel)* 7(7), 511.

Hall R (1981) Benomyl increases the selectivity of the Nash-Snyder medium for *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*. *Can J Plant Pathol* 3(1), 47-52.

## 13. Anlagen

Patientenaufklärung und -einwilligung, Dokumentationsbogen I (Keratitis),  
Dokumentationsbogen II (Systemische Infektion)