

2. Material und Methoden

2.1. Retrospektive Auswertungen

2.1.1. Patienten

In einer retrospektiven Arbeit haben wir die Krankenakten von 104 Patienten mit einer aktiven Toxoplasma-Retinochorioiditis ausgewertet. Dabei handelt es sich um Unterlagen zu sämtlichen Patienten, die sich von 1996 bis 2002 wegen dieser Erkrankung in der Universitäts-Augenklinik der Charité Berlin, Campus Virchow-Klinikum vorgestellt hatten. Wir entwickelten ein Studienprotokoll und erfassten darin die Daten zu folgenden Punkten:

2.1.2. Beobachtungszeitraum

Anhand der Akteneinträge wurde die Dauer der Beobachtung jedes einzelnen Patienten dokumentiert. Der Nachbeobachtungszeitraum wurde in Monaten erfasst.

2.1.3. Demographie

Zur Bestimmung der demographischen Verteilung wurden folgende Daten erhoben:

- Alter des Patienten bei Vorstellung
- Alter bei Beginn der Erkrankung
- Geschlecht
- Betroffenes Auge

2.1.4. Spaltlampenmikroskopische und funduskopische Befunde

Bei allen Patienten wurden die vorderen und hinteren Augenabschnitte mit der Spaltlampe und dem Ophthalmoskop untersucht. Die nachfolgend aufgelisteten Befunde wurden den Akteneinträgen bei Erstvorstellung (akutes Stadium) sowie nach Ablauf der Entzündung entnommen. Als Endpunkt der Entzündung wurde die scharfe Abgrenzung des Herdes mit Ausbildung einer retinochorioidalen Narbe festgelegt.

Die Befunde des vorderen Augenabschnitts enthielten Angaben über

- Den Zustand der Bindehaut, Hornhaut und Sklera
- Zeichen eines Vorderkammer-Reizzustands, ausgedrückt als Zellen 1-4 sowie Tyndall + - +++
- Zustand der Linse

Die Befunde des hinteren Augenabschnitts enthielten Angaben über

- Einen Glaskörperreizzustand
- Morphologische Merkmale und Lokalisation der Toxoplasma-Retinochorioiditis

Ergänzende klinische Befunde: Die Augeninnendruck-Messung erfolgte bei jeder Untersuchung mit dem Goldmann Applanationstonometer.

Die Sehschärfenprüfung der Patienten wurde in Verbindung mit einer automatischen Refraktionsbestimmung durchgeführt. Zur subjektiven Refraktionsbestimmung wurden Zahlen als Sehzeichen angeboten. Der Visus wurde als Dezimalzahl notiert.

Bei Bedarf erfolgte eine Fluoreszenzangiographie. Nach intravenöser Gabe eines fluoreszierenden Farbstoffs werden in bestimmten Zeitabständen Fundusfotografien angefertigt, die eine Beurteilung der Gefäße ermöglichen. Bei frischen Entzündungsherden tritt Farbstoff aus den geschädigten Gefäßen aus und führt zu multiplen oder konfluierenden Quellpunkten.

2.1.5. Perimetrie

Zur ergänzenden klinischen Verlaufsbeobachtung und um das Ausmaß funktioneller Schäden beurteilen zu können wurde eine Gesichtsfelduntersuchung durchgeführt. Peripapilläre Läsionen führen durch die Unterbrechung des peripheren Nervenfaserverlaufs und den segmentalen Verlust der Nervenfaserschicht zu Skotomen, die von den Patienten oft nicht wahrgenommen werden. Je näher sich die Entzündungsherde an der Papille befinden, desto größer ist der resultierende Gesichtsfeldverlust. Bei kleinen isolierten Läsionen in größerer Entfernung zur Papille kommt es zu bogenförmigen Defekten, während sektorförmige Ausfälle durch ausgedehnte oder kleine papillennahe Läsionen entstehen. Auch eine eventuelle direkte Beteiligung des Nervus opticus in Form einer Optikusatrophie oder einer ischämischen Optikusneuropathie kann durch die Perimetrie erkannt werden.

Bei 24 unserer Patienten mit retinochorioidalen Herden im Bereich der Makula oder mit einem Herd nahe der Papille erfolgte zusätzlich in regelmäßigen Abständen eine Gesichtsfelduntersuchung. Die Untersuchung des zentralen Gesichtsfeldes fand in Form der schwellenbestimmenden automatischen Rasterperimetrie statt. Für diesen Zweck führten wir eine 30° Gesichtsfeldbestimmung (Programm 36, Octopus 500 EZ, Interzeag, Schweiz) durch. Vor der Untersuchung erfolgte eine Adaptation an die Umfeldleuchtdichte, die mit ca. 10 cd/m² im unteren photopischen Bereich lag. Refraktionsfehler wurden für die Untersuchung korrigiert. Den Patienten wurde entsprechend ihres Alters ein Nahzusatz angeboten.

Zur besseren statistischen Auswertbarkeit wurde jeweils der „mean defect“ der Gesichtsfelduntersuchung bestimmt. Dokumentiert wurden die Daten der ersten Messung bei Auftreten der Retinochorioiditis sowie der letzten Messung nach Ablauf der Entzündung.

2.1.6. Serologie

Die *Toxoplasma-gondii* IgM- und IgG-Antikörperbestimmung erfolgte in der mikrobiologischen Abteilung der Universitätsklinik Charité, durch den VIDAS TOXO IgG II und IgM-Test (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland).

VIDAS TOXO IgG II

Das Testprinzip kombiniert eine 2-stufige immunenzymatische Methode, die auf dem Sandwichprinzip basiert, mit einer abschliessenden Fluoreszenzmessung (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Der Festphasenrezeptor (FPR) dient gleichzeitig als Festphase und Pipettiersystem für den Test. Die Testreagenzien befinden sich gebrauchsfertig im Reagenzienriegel.

Alle Reaktionsschritte werden automatisch vom Gerät durchgeführt. Das Reaktionsmedium wird dabei mehrfach vom FPR aspiriert und wieder abgegeben.

In der Probe vorhandene anti-*Toxoplasma-gondii*-IgG-Antikörper binden an die am FPR fixierten *Toxoplasma gondii*-Antigene. Nicht gebundene Bestandteile werden durch Waschschriffe entfernt. Mit alkalischer Phosphatase markierte, monoklonale anti-human IgG (Maus) werden im FPR aspiriert und wieder abgegeben und binden an die am FPR fixierten humanen IgG. Während des letzten Nachweisschrittes wird das Substrat (4-Methylumbelliferyl-phosphat) im FPR aspiriert und wieder abgegeben. Das Enzymkonjugat katalysiert dessen Hydrolyse in ein fluoreszierendes Produkt (4-Methylumbelliferon), dessen Fluoreszenz bei 450 nm gemessen wird. Die Intensität der Fluoreszenz ist der Antikörper-Konzentration in der Probe proportional. Nach Beendigung des Tests werden die Ergebnisse automatisch vom VIDAS-Gerät in Bezug auf eine gespeicherte Eichkurve berechnet und ausgedruckt.

VIDAS TOXO IgM

Das Testprinzip kombiniert eine immunenzymatische μ -capture Methode mit einer abschliessenden Fluoreszenzmessung (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Der Festphasenrezeptor (FPR) dient gleichzeitig als Festphase und Pipettiersystem für den Test. Die Testreagenzien befinden sich gebrauchsfertig im Reagenzienriegel. Alle Reaktionsschritte werden automatisch vom Gerät durchgeführt. Das Reaktionsmedium wird dabei mehrfach vom FPR aspiriert und wieder abgegeben. Nach der Probenverdünnung binden die IgM an den am FPR gebundenen polyklonalen Antikörper. Toxoplasma-IgM wird spezifisch durch das inaktivierte Toxoplasma-Antigen detektiert, welches selbst durch einen mit alkalischer Phosphatase markierten monoklonalen anti-Toxoplasma-Maus-Antikörper nachgewiesen wird. Während des letzten Nachweisschrittes wird das Substrat (4-Methyl-umbelliferyl-phosphat) im FPR aspiriert und wieder abgegeben. Das Enzymkonjugat katalysiert dessen Hydrolyse in ein fluoreszierendes Produkt (4-Methyl-umbelliferon), dessen Fluoreszenz bei 450 nm gemessen wird. Die Fluoreszenzintensität ist der in der Probe vorhandenen Antikörperkonzentration proportional. Nach Beendigung des Tests wird automatisch ein Index in Bezug auf den gespeicherten Standard S1 berechnet und ausgedruckt.

2.1.7. Kammerwasseranalyse

Bei insgesamt 74 der 104 Patienten wurde eine Vorderkammerpunktion durchgeführt. Die zur Kammerwasser-Gewinnung notwendige Punction wurde von erfahrenen Fachärzten der Augenklinik in einem Operationssaal unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

Zur Vorderkammerpunktion wurde unter mikroskopischer Kontrolle nach sterilem Abdecken des OP-Feldes und nach topischer Anästhesie ein Lidsperrer eingesetzt und der Bulbus mit einer Fassungspinzette fixiert. Daraufhin wurde eine Parazentese am temporalen Limbus vorgenommen, durch die eine 30G Kanüle parallel zur Iris in die Vorderkammer eingeführt wurde. Über eine mit der Kanüle verbundene Einwegspritze wurden etwa 0,1 bis 0,3 ml Kammerwasser aspiriert. Gleichzeitig erfolgte die Entnahme von 5 ml Serum.

Die Kammerwasserproben wurden mit einem von uns bereits früher beschriebenen, modifizierten Micro-ELISA-Test (Behring, Marburg) auf eine intraokuläre Antikörpersynthese gegen *Toxoplasma gondii* hin untersucht [49]. Mit ihr kann eine intraokuläre IgG Produktion nachgewiesen werden. Diese Technik wurde 1983 von Hartmann vorgestellt und basiert auf Erkenntnissen der Liquordiagnostik. Im Gegensatz zu früheren Verfahren, die mit festen Ausgangsverdünnungen arbeiteten, werden Kammerwasser und Serum auf einen standardisierten IgG-Gehalt (1mg/dl) verdünnt. Dies hat den Vorteil, dass bei hoher IgG-Konzentration sehr wenig Probenmaterial eingesetzt werden muss. In weiteren Verdünnungsreihen wird jeweils spezifisch IgG gegen *Toxoplasma gondii* bestimmt, wobei sich eine lokale Antikörperproduktion dadurch darstellt, dass spezifisches IgG in höherer Verdünnung im Kammerwasser als im Serum nachweisbar ist (Abb. 2).

Alle Proben wurden auf eine intraokulare Antikörpersynthese gegen *Toxoplasma gondii* untersucht. Bei Vorhandensein einer ausreichenden Kammerwasserprobe erfolgte zusätzlich die Bestimmung von IgG-Antikörper gegen Zytomegalie- (CMV), Herpes Simplex- (HSV) und Varizella-Zoster-Virus.

Zum Ausschluss anderer Ursachen wurden in einigen Fällen weitere serologische Zusatzuntersuchungen durchgeführt: HSV-, VZV-, EBV-, CMV-, Lues-, Borrelien-Serologie, ANCA, ANA und Vaskulitis-Serologie.

Als Vergleichsgruppe wurden die Kammerwasseranalysen von insgesamt 25 Patienten herangezogen. Dabei handelte es sich um Patienten, deren Uveitis anderer Ätiologie war. Im Einzelnen waren dies 19 Patienten mit einer Uveitis posterior (12x idiopathisch, 1x HSV-, 2x VZV-Retinitis, 1x Toxokara, 3x Vaskulitis unklarer Genese) und 6 Patienten mit einer Panuveitis (2x Borreliose, 1x HSV, 1x VZV, 2 unklarer Genese). Das Durchschnittsalter in der Kontrollgruppe betrug 46 Jahre (32 bis 53 Jahre).

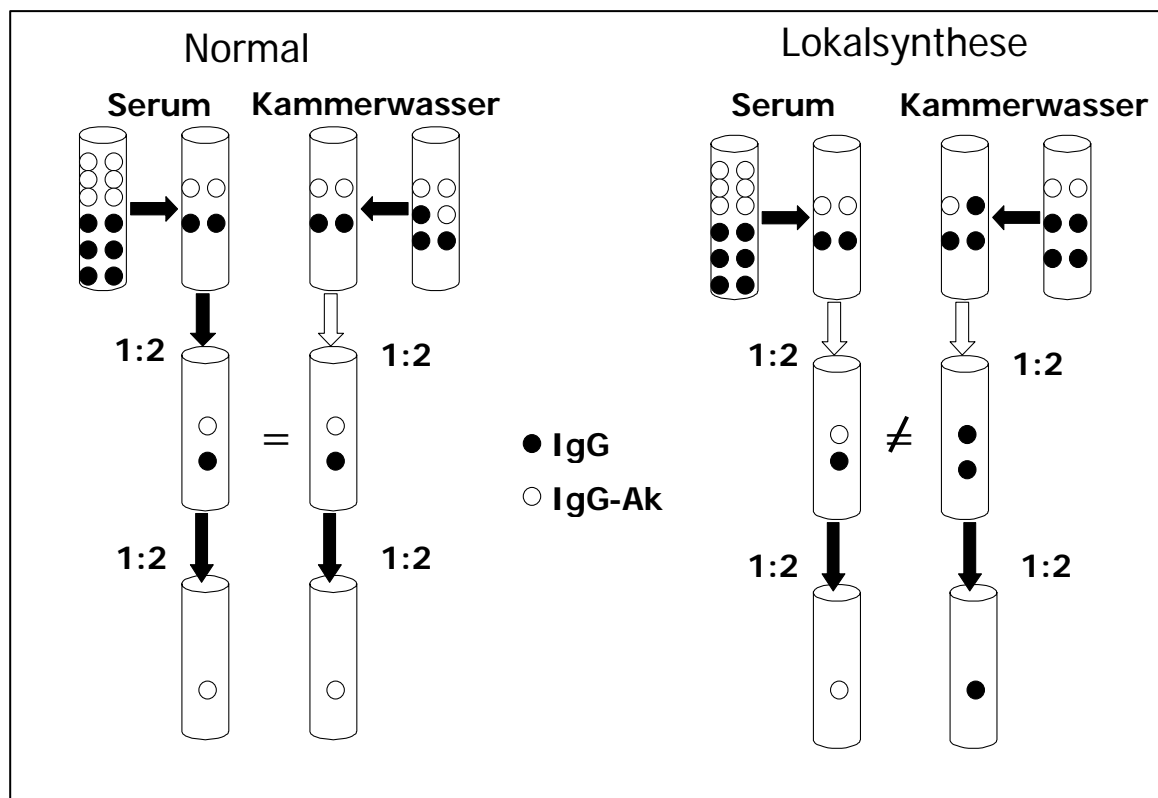


Abb. 2: Kammerwasser und Serum werden auf einen standardisierten IgG-Gehalt (1mg/dl) verdünnt. In weiteren Verdünnungsreihen wird jeweils spezifisch IgG gegen *Toxoplasma gondii* bestimmt, wobei sich eine lokale Antikörperproduktion dadurch darstellt, dass spezifisches IgG in höherer Verdünnung im Kammerwasser als im Serum nachweisbar ist

2.1.8. Therapie der okulären Toxoplasmose

Alle 104 Patienten mit akuter Toxoplasma-Retinochorioiditis erhielten ein standardisiertes Therapieregime mit oraler Gabe von Clindamycin. Die Dosierung betrug 4-mal täglich 300 mg per os. Die Therapie wurde mindestens 4 Wochen fortgeführt. Kriterium zur Therapiebeendigung war die Abgrenzung des frischen Herdes sowie ein Rückgang der Entzündungszellen im Glaskörper. Sprach die Therapie mit Clindamycin nicht an, so wurde sie auf eine Kombination aus Pyrimethamin und Sulfadiazin umgestellt. Im Falle einer zentralen Lokalisation des Entzündungsherdes oder einer schweren Vitritis wurde die antibiotische Therapie durch eine systemische Prednisolongabe ergänzt. Die initiale Dosis betrug dabei max. 1mg/kg Körpergewicht und wurde in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf reduziert.

Die Dokumentation des angewendeten Therapieregimes berücksichtigte auch Angaben über die Dauer der Therapie, mögliche Nebenwirkungen und ggf. auch eine Umstellung der Therapie beziehungsweise eine Änderung der Dosierung.

2.2. Umfrage zur Diagnostik und Therapie der okulären Toxoplasmose

Um eine Übersicht über die unterschiedlichen Verfahrensweisen in der Diagnostik und Therapie der okulären Toxoplasmose in Deutschland zu gewinnen, haben wir eine schriftliche Umfrage durchgeführt. Wir entwickelten dazu einen detaillierten Fragebogen und versendeten ihn an 40 Mitglieder der Sektion Uveitis der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG). Ergebnisse einer ähnlichen Umfrage innerhalb der nordamerikanischen Uveitis Society wurden 1991 und 2002 veröffentlicht [45, 48]. Da im europäischen Raum eine höhere Prävalenz der Toxoplasma-Retinochorioiditis vorliegt, wollten wir die Ergebnisse unserer Umfrage mit denen der amerikanischen vergleichen. Während die o.g. Arbeiten Therapiealternativen der okulären Toxoplasmose zum Gegenstand hatten, haben wir in unserer Umfrage auch zusätzlich das Spektrum diagnostischer Möglichkeiten mitberücksichtigt.

Der Fragebogen bestand aus 15 allgemeinen Fragen zum diagnostischen Vorgehen und zu verschiedenen Therapie-Strategien bei okulärer Toxoplasmose. Zusätzlich wurden den befragten Kollegen anhand von drei ausgewählten Beispielen spezifische patientenbezogene Fragen zum diagnostischen und therapeutischen Procedere gestellt. Die Fragen wurden zur besseren Auswertbarkeit in „multiple choice“-Form verfasst. Zusätzlich konnten die befragten Kollegen in dafür vorgesehenen Feldern Kommentare beifügen. Die an der Umfrage teilnehmenden Kollegen wurden gebeten, die Zahl der von Ihnen behandelten Patienten pro Jahr anzugeben.

Hinsichtlich der diagnostischen Mittel wurde nach Indikationen und Methodik der serologischen Diagnostik sowie der Kammerwasseruntersuchung gefragt.

Die augenärztlichen Kollegen wurden darüber hinaus nach ihrer Therapie der ersten Wahl gefragt. Weitere Fragen bezogen sich auf Indikationen zur Therapieumstellung, der Therapiedauer, der möglichen Kombination einer antibiotischen Therapie mit systemischen Steroiden. Dabei wurde insbesondere auch nach möglichen Einflussgrößen bei der Indikationsstellung wie Sehschärfe, Größe der Läsion und Glaskörperbeteiligung gefragt. Auch die Anwendung operativer Maßnahmen wie Kryotherapie, Laserkoagulation und Vitrektomie waren Inhalt der Befragung.

Zusätzlich wurden den befragten Ophthalmologen 3 exemplarische Patientendaten mit Fragen zum Management dargeboten. Diese Fallbeispiele stellen klinische Standardsituationen dar, die möglicherweise einer unterschiedlichen Verfahrensweise bedürfen. Dabei handelt es sich um einen immunkompetenten Patienten mit peripherer Toxoplasma-Retinochorioiditis, einen immunsupprimierten Patienten mit vergleichbarem Befund sowie um einen immunkompetenten Patienten mit akuter, visusbedrohender Retinochorioiditis.

Im Detail handelte es sich um folgende Fragen:

1. In welcher medizinischen Einrichtung üben Sie Ihre ärztliche Tätigkeit aus?

- Einzelpraxis /Gemeinschaftspraxis
- Klinische Einrichtung
- Hochschulmedizin

2. Wie viele Uveitis-Patienten werden jährlich von Ihnen gesehen?

- weniger als 50
- 50 bis 200
- mehr als 200

3. Wie viele Patienten mit einer Toxoplasmose Retinochorioiditis werden jährlich von Ihnen gesehen?

- weniger 5
- 5 bis 10
- 10 bis 20
- mehr als 20

4. Welche diagnostischen Mittel verwenden Sie zur Diagnose einer Toxoplasmose-Retinochorioiditis?

- Wir diagnostizieren allein anhand des klinisch-ophthalmoskopischen Befundes
- Serologie
- Kammerwasseranalyse (Elisa-Verfahren)
- Kammerwasseranalyse (PCR)

5. Serologie:

Falls Sie eine serologische Diagnostik bei Erstmanifestation durchführen basiert diese auf:

- pos. IgM-Nachweis
- pos. IgA-Nachweis
- IgG Titeranstieg

6. Falls Sie eine Kammerwasseranalyse durchführen:

Welches Verfahren wenden Sie an?

- PCR-Analyse
- Intraokulare IgG-Antikörperbestimmung
- Intraokulare IgA-Antikörperbestimmung
- Kombination PCR-Analyse und intraokuläre Antikörpersynthese

7. Wann stellen Sie bei Patienten mit einer Toxoplasmose Retinochorioiditis die Indikation zur Kammerwasseranalyse?

- bei allen Patienten
- zur Diagnosesicherung bei atypischer Manifestation
- nur bei unklaren Netzhautbefunden

8. Wenn Sie eine medikamentöse Therapie für notwendig halten, welche der unten genannten Medikamente oder Kombinationen wenden Sie als 1. Wahl an?

- Pyrimethamin + Sulfadiazin
- Clindamycin
- Clindamycin + Pyrimethamin + Sulfadiazin
- Trimethoprim + Sulfadiazin
- Sonstige: Azithromycin
 - Spiramycin
 - Atovaquon
 - Tetracyclin

9. Ändern Sie Ihre medikamentöse Behandlung bei Patienten die nicht auf die Therapie ansprechen?
- ja, von _____ auf _____
- nein
10. Ändern Sie Ihre medikamentöse Behandlung bei Patienten mit ≥ 2 visusbedrohenden Rezidiven?
- ja, von _____ auf _____
- nein
11. Wann ergänzen bei einer akuten Sie Steroide
- immer
- bei visusbedrohenden Läsionen am hinteren Pol
- abhängig von der Größe der Läsion
- abhängig von der Glaskörperbeteiligung
- nie
12. Welche **nicht**medikamentöse Therapie der Toxoplasmose-Retinochorioiditis führen Sie durch?
- Laserkoagulation
- Kryokoagulation
- Vitrektomie
13. Erworbene Toxoplasmose im letzten Trimenon der Schwangerschaft:
- Würden Sie ein Neugeborenes mit serologisch nachgewiesener konnataler Toxoplasmose **ohne** retinochorioiditische Veränderungen behandeln?
- ja
- nein

14. Würden Sie im o.g. Fall regelmäßige Kontrolluntersuchungen durchführen?

ja

nein

15. Wenn ja, welches Kontrollintervall schlagen Sie im ersten Jahr vor?

wöchentlich

¼ jährlich

½ jährlich

16. Ordnen Sie bitte folgenden Kasuistiken die zutreffenden Antworten zu.

Patient 1 (immunkompetent)

Erstmanifestation einer akuten, typischen Toxoplasmose Retinochorioiditis Läsion außerhalb der Gefäßbögen Abb. 3 (keine Glaskörperinfiltration, keine Visusminderung) .

- Wie stellen Sie die Diagnose?

1. Klinisches Bild

2. Serologie

3. intraokulare Diagnostik

Kammerwasser

Glaskörperaspirat

nur 1

immer 1 und 2

immer 1 und 3

immer 1,2 und 3



Abb. 3: Akuter peripherer Herd

- Halten Sie eine medikamentöse Therapie für erforderlich? ja

nein

- Wenn ja, mit welchem Medikament oder Medikamenten- Kombination behandeln Sie den Patienten?

- Kombinieren Sie die obige Therapie mit Steroiden? ja

nein

- Dauer der Behandlung

mindestens 4 Wochen

nach klinischem Befund (Pigmentierung der retinochorioiditischen Läsionen)

nach funktionellem Verlauf

Patient 2 (immunsupprimiert)

Erstmanifestation einer akuten, typischen Toxoplasmose Retinochorioiditis Läsion außerhalb der Gefäßbögen (Abb. 4).

- Wie stellen Sie die Diagnose?

1. Klinisches Bild

2. Serologie

3. intraokulare Diagnostik

Kammerwasser

Glaskörperaspirat

nur 1

immer 1 und 2

immer 1 und 3

immer 1,2 und 3



Abb. 4: Akuter peripherer Herd

- Halten Sie eine medikamentöse Therapie für erforderlich? ja

nein

- Wenn ja, mit welchem Medikament oder Medikamenten- Kombination behandeln Sie den Patienten?

- Kombinieren Sie die obige Therapie mit Steroiden? ja

nein

- Dauer der Behandlung

mindestens 4 Wochen

nach klinischem Befund (Pigmentierung der retinochorioiditischen Läsionen)

nach funktionellem Verlauf

Patient 3 (immunkompetent)

Akute, Visus-bedrohende, typische Retinochorioiditis Läsion am hinteren Pol.

- Wie stellen Sie die Diagnose?

1. Klinisches Bild

2. Serologie

3. intraokulare Diagnostik

Kammerwasser

Glaskörperaspirat

nur 1

immer 1 und 2

immer 1 und 3

immer 1,2 und 3



Abb. 5: Zentraler Herd

- Halten Sie eine medikamentöse Therapie für erforderlich? ja

nein

- Wenn ja, mit welchem Medikament oder Medikamenten- Kombination behandeln Sie den Patienten?

- Kombinieren Sie die obige Therapie mit Steroiden? ja

nein

- Dauer der Behandlung

mindestens 4 Wochen

nach klinischem Befund (Pigmentierung der retinochorioiditischen Läsionen)

nach funktionellem Verlauf

2.3. Statistische Analysen

Zur Beantwortung der verschiedenen Fragestellungen haben wir unser Datenmaterial mit Hilfe folgender Tests untersucht:

- In einer Analyse der demographischen Daten teilten wir die Patienten in Gruppen von jeweils einer Lebensdekade ein und untersuchten eine Abhängigkeit des Geschlechts erkrankter Patienten von ihrem Alter. Es wurde eine sog. Crosstabulation erstellt und eine mögliche Signifikanz mit dem Chi-Square-Test untersucht.
- Die Abhängigkeit der notwendigen Therapiedauer von der Art der behandelten intraokularen Entzündung (Erstmanifestation vs. Rezidiv) wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests untersucht. Da sich im one-sample-Kolmogorov-Smirnov-Test keine Normalverteilung zeigte war dafür ein nichtparametrischer Test notwendig.
- Um eine mögliche Abhängigkeit der Therapiedauer vom Alter der Patienten zu prüfen haben wir die sog. Pearson-Correlation, bzw. bei Gruppierung in Dekaden den Kruskal-Wallis-Test (nichtparametrisch) angewendet.
- Die Frage nach einer möglichen Verkürzung der Therapiedauer durch Gabe von Kortikosteroiden in Addition zur antibiotischen Therapie wurde unter Zuhilfenahme des nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests untersucht.
- Der Vergleich der Sehschärfe vor und nach Behandlung erfolgte mit dem Wilcoxon Signed Ranks Test
- Auch die Abhängigkeit der resultierende Sehschärfe von der Gabe von Kortikosteroiden wurde mit dem Wilcoxon-Signed-Ranks-Test und dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Test geprüft.

- Eine mögliche Korrelation von Sehschärfe und Alter des Patienten wurde mit der Pearson-Correlation geprüft.
- Die Antworten des Fragebogens wurden numerisch angegeben und in % umgerechnet.