

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Vergleich zweier PCR-Nachweisverfahren zur  
Früherkennung einer Aspergillusinfektion bei  
Hochrisikopatienten:**

**Manuelle DNA- Extraktion im Vergleich zur  
automatischen MagNa Pure DNA- Extraktion  
Konventionelle PCR- ELISA im Vergleich zur  
LightCycler®- Methode**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

Vorgelegt von  
Mariam Khatiri  
Aus Teheran

2006

Dekan:

Herr Professor Dr. C. Claussen

1. Berichtersteller:

Herr Professor Dr. H. Einsele

2. Berichtersteller:

Frau Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Meinen Eltern und Michael

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1.EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aspergillus spp. ....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Biologie des Aspergillus.....	1
1.1.2 Epidemiologie und Pathogenese .....	1
<b>1.2 Erkrankung und Problematik bei Immunsuppression.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Erkrankung und Klinik .....	3
<b>1.3 Risikogruppen .....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Stammzelltransplantation.....	5
1.3.1.1 Die Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) .....	5
1.3.1.2 Probleme der Stammzelltransplantation .....	6
1.3.1.3 Invasive Aspergillose nach der HSCT.....	7
<b>1.4 Diagnostik.....</b>	<b>8</b>
1.4.1 Histologie/ Cytologie/ Mikroskopie .....	8
1.4.2 Kultur .....	9
1.4.3 Bildgebende Verfahren .....	9
1.4.4 Antigennachweis.....	10
1.4.5 Antikörpernachweis.....	11
1.4.6 DNA-Nachweis mittels PCR.....	11
<b>1.5 Therapie und Prophylaxe.....</b>	<b>12</b>
1.5.1 Prophylaxe.....	12
1.5.2 Therapie.....	13
1.5.2.1 Amphotericin B .....	13

1.5.2.2 Itraconazol .....	14
1.5.2.3 Voriconazol .....	15
1.5.2.4 Caspofungin.....	15
1.5.2.5 Chirurgische Resektion.....	16
1.5.2.6 Immunmodulatoren.....	16
<b>1.6 Definition der invasiven Aspergillosen .....</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>18</b>
<b>2. MATERIAL, METHODEN UND PATIENTEN .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Material und Bezugsquellen .....</b>	<b>20</b>
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Verbrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.3 Chemikalien .....	22
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.2.1 DNA-Extraktion .....	23
2.2.1.1 Manuelle DNA-Extraktion.....	23
2.2.1.2 DNA-Extraktion mit MagNA Pure LC .....	24
2.2.2 PCR .....	26
2.2.2.1 Konventionelle PCR & PCR-ELISA.....	26
2.2.2.2 PCR mit dem LightCycler® .....	28
2.2.2.3 Ausschluß von DNA-Inhibierung.....	30
2.2.2.4 Variationen der Probenkonzentration im Mastermix .....	31
2.2.2.5 Kontaminationsmonitoring .....	32
2.2.2.6 Positivkontrolle.....	32
2.2.2.7 Statistische Analyse.....	32
<b>2.3 Patienten .....</b>	<b>33</b>

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Darstellung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der verschiedenen Materialien.....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Darstellung der positiven Ergebnisse.....	37
<b>3.2 Ergebnisse der PCR- ELISA .....</b>	<b>38</b>
3.2.1 Ergebnisermittlung mittels PCR-ELISA.....	38
3.2.2 Ergebnisse PCR-ELISA .....	38
3.2.3 Tabellarische Darstellung der Proben mit Übereinstimmung der positiven Ergebnisse bei der manuellen sowie bei der automatischen MagNa Pure Extraktion.....	39
<b>3.3 Ergebnisse des LightCycler®.....</b>	<b>40</b>
3.3.1 Ergebnisermittlung mittels LightCycler®.....	40
3.3.2 Ergebnisse LightCycler® .....	41
3.3.3 Ausschluß der Inhibierung .....	41
3.3.4 Variationen der Methoden.....	41
3.3.4.1 Variationen der DNA-Extraktion mittels PCR .....	41
3.3.4.2 Variationen der Konzentrationen im Mastermix .....	42
3.3.4.3 Verdünnung der Proben.....	42
<b>3.4 Darstellung der Ergebnisse in Bezug auf die verschiedenen Patientengruppen.....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Patienten mit sicherer Aspergillose nach der EORTC-Einteilung .....	42
3.4.2 Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose nach der EORTC-Einteilung .....	44
3.4.3 Darstellung der Ergebnisse der Patienten mit möglicher Aspergillose.	45
3.4.4 Patienten ohne Anhalt für eine invasive Aspergillose .....	46
3.4.5 Ergebnisse der statistischen Auswertung .....	47

<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1 Stand der Forschung</b> .....	<b>48</b>
4.1.1 Diagnoseschwierigkeiten .....	49
4.1.2 Detektion von Aspergillen mittels PCR .....	49
4.1.3 Vergleich PCR-ELISA versus Real-time-PCR mit dem LightCycler® ..	51
4.1.5 DNA-Extraktionsmethoden .....	52
4.1.6 Verwendbare Proben .....	54
4.1.7 Vergleich der PCR mit anderen etablierten Detektionsverfahren.....	54
<b>4.2 Ergebnisse</b> .....	<b>55</b>
4.2.1 Patienten mit sicherer und wahrscheinlicher Diagnose einer IA .....	56
4.2.2 Leistungsvergleich LightCycler® versus PCR-ELISA .....	57
4.2.2 Leistungsvergleich MagNa Pure versus manueller DNA-Extraktion ....	59
<b>4.3 Kontaminationen</b> .....	<b>60</b>
<b>4.4 Zukunft</b> .....	<b>61</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>62</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>64</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>76</b>
<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Aquired immunodeficiency syndrome
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BMT	Bone marrow transplantation
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
DNA	Desoxy ribo nucleic acid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylen Diamine Tera-Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierende Faktoren
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierende Faktoren
GvHD	Graft versus host disease
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HLA	Humane Leukozytenantigene
HRCT	High Resonance Computer Tomographie
HSCT	Hematopoetic stem cell transplantation
IA	Invasive Aspergillose
IFICG	Invasive Fungal Infections Cooperative Group
KMT	Knochenmarktransplantation
LC	LightCycler®
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MGPs	Magnetic glasa particles
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MSG	Mycoses Study Group



NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
PBSCT	Peripheral bloodstem cell transplantation
PCR	Polymerase chain reaction
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentralnervöses System

Nm	Nanometer
µl	Mikroliter
sec	Sekunden
min	Minuten
h	Stunden

# **1. Einleitung**

## **1.1 *Aspergillus spp.***

### **1.1.1 Biologie des *Aspergillus***

Der *Aspergillus* gehört zu den Faden- und Schimmelpilzen mit septiertem Myzel. Es gibt ungefähr 200 verschiedene Arten von *Aspergillen*. Diese sind sehr resistent gegen Umwelteinflüsse und können daher bei jeder Temperatur und Wetterlage überleben.

Sie kommen weltweit ubiquitär vor. Vor allem im Erdboden, in organischen Abfällen, Komposthaufen, Blumentöpfen, aber auch bei Umbaumaßnahmen in Krankenhäusern findet man eine hohe Anzahl an *Aspergillus*sporen.

*Aspergillen* produzieren verschiedene extrazelluläre Produkte wie Proteasen, Katalasen, Phospholipasen und toxische Metabolite wie Aflatoxine und Gliotoxine, deren Rolle als Virulenzfaktoren noch nicht vollständig geklärt ist.

Gliotoxine und Aflatoxine haben unter anderem immunmodulierende Effekte. Hierbei werden die Phagozyten und die adaptive Immunantwort gehemmt (Staib et al., 2000).

### **1.1.2 Epidemiologie und Pathogenese**

Die Aspergillose ist eine weltweit verbreitete Erkrankung. Humanpathogene Spezies gehören zu 90% zur Gattung *Aspergillus fumigatus*, gefolgt von *Aspergillus flavus* und *Aspergillus niger* (Latge, 1999; Bretagne, 2003). Die Inzidenz der Infektion mit anderen *Aspergillus*spezies ist in den letzten Jahren gestiegen (Singh, 2001; Baddley et al., 2001).

Die Infektion wird meist durch Inhalation der *Aspergillus*sporen übertragen, jedoch ist eine Übertragung durch Hautdefekte, Lebensmittel etc. ebenfalls möglich.

Durch ihre geringe Sporengröße von 2-3 µm gelangen sie bis in die Alveolen, wo sie Hyphen ausbilden können. Ferner können sich die Konidien durch Adhäsine an Fibrinogen von Schleimhautoberflächen binden.

Als opportunistische Infektion tritt die invasive Aspergillose hauptsächlich bei immungeschwächten Patienten auf (Trevino-Castellano et al., 2003).

Die Inzidenz beträgt bei Knochenmarktransplantationen und hämatologischen Erkrankungen zwischen 4% - 25% (Jantunen et al., 2002; Denning, 1998, Latge, 1999). In den letzten Jahren ist die Inzidenz der Aspergillosen deutlich gestiegen, während die Zahl der Candidainfektionen aufgrund der Prophylaxe zurückgegangen ist (Singh, 2001; Oliveira et al., 2002). Dies kann auf die wachsende Zahl immunsupprimierter Patienten, die besseren Diagnosemöglichkeiten, neue Transplantationsmodalitäten oder auch neue immunsuppressive Medikamente etc. zurückgeführt werden.

Eine Infektion mit Aspergillen kann zu verschiedenen Krankheitsbildern führen (Stevens et al., 2000; Latge, 1999; Lin et al., 2001; Golbang et al., 1999).

Eine mögliche Manifestationsform sind Aspergillome, welche vor allem in vorgeschädigten Organen, wie zum Beispiel in der Lunge nach einer Tuberkuloseerkrankung oder in den Nasennebenhöhlen mit vorbestehender chronischer Sinusitis entstehen.

Bei immunkompetenten Menschen können Aspergillen eine allergische bronchopulmonare Aspergillose auslösen.

Beim immunsupprimierten Patienten kann es dann zum Krankheitsbild der invasiven Aspergillose kommen.

## ***1.2 Erkrankung und Problematik bei Immunsuppression***

Bei intakter Immunabwehr kann eine Infektion meist verhindert werden. Hierbei schützt das unspezifische Immunsystem, vor allem das Makrophagen-Phagozyten-System vor einer invasiven Infektion (Latge, 1999). Bei geschwächtem Immunsystem kann sich der Erreger vermehren und zu dem

fatalen Krankheitsbild der invasiven Aspergillose führen. Zumeist sind die Lungen betroffen (Golbang et al., 1999; Denning, 1998; Lin et al., 2001), es können aber auch andere Organe wie Augen, Sinus, das Tracheobronchialsystem, die Haut sowie das ZNS betroffen sein. Auch Verbrennungen können eine Infektion mit Aspergillen begünstigen (Einsele et al., 1997; Denning, 1998).

Die Problematik der Erkrankung ist die extrem hohe Mortalitätsrate, die bei bis zu 90% liegt (Einsele et al., 1997; Jantunen et al., 2002).

Dies hat verschiedene Gründe. Zum einen ist die Therapie nicht ausreichend effektiv (Patterson et al., 2000; Lin et al., 2001), zum anderen sind die eingesetzten Medikamente in hohem Maße toxisch. Darüber hinaus gibt es bisher keine einheitliche Strategie, mit der eine große Heilungsrate erzielt werden kann.

Für die Prognose der Erkrankung ist es essentiell, die Krankheit möglichst früh zu diagnostizieren und zu behandeln (Loeffler et al., 2001; Maschmeyer et al., 2003; Kami et al., 2001). Dies gelingt jedoch oftmals nicht, da die Diagnose der Aspergillose häufig erst sehr spät gestellt wird (Hawkins et al., 1984; Spiess et al., 2003; Van Belkum et al., 1993). Die Gründe dafür sind die unspezifische Klinik und der Mangel an einfach durchführbaren, sensiblen und spezifischen Diagnostikmethoden (Hebart et al., 2000a; Alexander, 2002).

### **1.2.1 Erkrankung und Klinik**

Zumeist ist bei einer Infektion die Lunge betroffen (Pfaffenbach et al., 1994; Golbang et al.; 1999, Van Belkum et al., 1993).

Durch hämatogene Invasion können die Erreger in andere Organe streuen.

Da die Symptome einer Aspergillose sehr unspezifisch sind, können sie grundsätzlich auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen vorkommen.

Klinisch manifestiert sich eine Aspergillose häufig mit therapierefraktärem Fieber, Schmerzen im Brustbereich, Husten, Hämoptysen und Dyspnoe (Caillot et al., 1997; Gerson et al., 1985; Latge, 1999; Denning, 1998).

Zudem verlaufen 25%-30% der Aspergilloseerkrankungen symptomlos (Denning, 1998).

In 10%-20% der Fälle tritt ein ZNS-Befall auf, der mit einer hohen Letalität von bis zu 100% einhergeht (Denning, 1998). Bei Symptomen wie Kopfschmerzen, Wesensveränderung, Hirnnervenausfällen, Hemiplegie, Krampfanfällen sollte differentialdiagnostisch auch eine IA in Betracht gezogen werden.

Die IA kann außerdem zu einer Sinusitis führen, welche sich in Form von Fieber, Husten, Kopfschmerzen, Halsschmerzen und Rhinitis äußert (Denning, 1998).

Die Hautaspergillose wird häufig bei neutropenischen Patienten mit zentralvenösem Katheter beobachtet. Auch Frühgeborene und Kinder mit AIDS sind durch die Hautmanifestation gefährdet (Van Burik et al., 1998a; Rowen et al., 1995; Larkin et al., 1996).

Klinisch zeigt sich ein schnell wachsendes Erythem, das mit Schmerzen einhergehen und nekrotisieren sowie ulzerieren kann (Denning, 1998; Larkin et al., 1996).

### **1.3 Risikogruppen**

Verschiedene Risikofaktoren begünstigen eine invasive Aspergillose. Der folgenreichste Faktor ist die angeborene oder erworbene Immunsuppression.

Dabei spielt die Granulozytopenie oder die Granulozytendysfunktion als patientenbezogener Faktor eine entscheidende Rolle (Wiederhold et al., 2003).

Je höher der Schweregrad der Granulozytopenie, besonders bei Neutropenie, und je länger deren Dauer ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, an einer invasiven Aspergillose zu erkranken.

Zugrunde liegende Erkrankungen, die eine Aspergillose auslösen können, sind unter anderem hämatologische Erkrankungen, AIDS, Autoimmunerkrankungen wie systemische Lupus erythematodes, metabolische Störungen wie Diabetes mellitus, extensive Operationen, Verbrennungen. (Loeffler et al., 1999; Loeffler et al., 2002b; Patterson et al., 2000; Denning, 1998).

Auch zytotoxische Chemotherapien und eine längere hochdosierte Verabreichung von Kortikosteroiden können zur Immunsuppression und somit zu einem erhöhten Infektionsrisiko führen (Wiederhold et al., 2003; Soubani et al., 2002; Skladny et al., 1999; Baddley et al., 2001).

Patienten, die sich einer Organtransplantation unterzogen haben, sind besonders gefährdet (Loeffler et al., 1999).

### **1.3.1 Stammzelltransplantation**

#### **1.3.1.1 Die Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)**

Bei zahlreichen hämatologischen Erkrankungen, Neoplasien und Autoimmunerkrankungen ist es möglich, durch hämatologische Stammzellen das fehlerhafte Knochenmark durch ein gesundes Knochenmark zu ersetzen.

Stammzellen können aus dem Knochenmark (BMT), peripherem Blut (PBSCT) oder postportalem Nabelschnurblut gewonnen werden (Schlegel, 2001).

Dadurch wird versucht, eine neue, funktionierende Hämatopoese zu aktivieren.

Die Stammzellen können vom Patienten selbst (autolog) oder einem möglichst immunkompatiblen Spender (allogen) stammen. Wenn sich in der Familie kein geeigneter Spender findet (Familienspender), besteht die Möglichkeit einer Fremdspende mit möglichst hoher genetischer Übereinstimmung.

Durch die Gewebstypisierung der humanen Leukozytenantigene (HLA) lässt sich ein passender Spender bestimmen. Das HLA-System basiert auf membrangebundenen Glykoproteinen, die auf nahezu allen Zellen

menschlicher Gewebe vorkommen. Sie können in höherer Zahl auf Leukozyten, vor allem auf Blutlymphozyten gefunden werden.

Das HLA-System wird autosomal kodominant vererbt und spielt bei immunologischen Abwehrmechanismen zur Unterscheidung von körperfremdem und körpereigenem Gewebe eine herausragende Rolle. Dem kommt auch große Bedeutung bei der Transplantatabstoßung zu.

### **1.3.1.2 Probleme der Stammzelltransplantation**

Nach einer allogenen Stammzelltransplantation kann es zu einer Graft-versus-host-disease (GvHD) kommen (Tabbara et al., 2002). Je niedriger die HLA-Kompatibilität der Spender und Empfänger ist, desto höher ist die Gefahr einer derartigen Komplikation.

Das neue Immunsystem wendet sich dabei gegen den ohnehin immunsupprimierten Empfänger. Die HLA-Antigene des Empfängers werden von den T-Zellen des Spenders als fremd erkannt und bekämpft.

Bis zu 100 Tage nach der Transplantation kann es zu einer akuten GvHD und nach über 100 Tagen zu einer chronischen GvHD kommen (Schlegel, 2001).

Durch eine GvHD können verschiedene Organe wie Haut, Leber und Darm in Mitleidenschaft gezogen werden.

Abgesehen von der GvHD kommt es im Rahmen der Immunsuppression, Neutropenie und den immunsupprimierenden Medikamenten zu einer erhöhten Infektanfälligkeit für Bakterien, Viren und Pilze. Die GvHD selbst und ihre Therapie gelten als idealer Nährboden für derartige Infektionen (Fukuda et al., 2003).

Zu weiteren Komplikationen können Rezidive, Graft failure, Veno-occlusive-Disease und die unerwünschten Wirkungen der verwendeten Medikamente führen.

### **1.3.1.3 Invasive Aspergillose nach der HSCT**

Nicht jeder transplantierte Patient hat das gleiche Risiko, an einer invasiven Aspergillose zu erkranken. Das Risiko einer Infektion hängt von verschiedenen Faktoren ab (Einsele et al., 2003; Wald et al., 1997).

Die zugrunde liegende Erkrankung und das dazugehörige Stadium sind bestimmende Faktoren. Beispielsweise weist eine AML mit bis zu 24% ein sehr hohes Risiko auf (Martino et al., 2002; Stevens, 2002).

Eine entscheidende Rolle spielt auch die gewählte Transplantationsmodalität. Die Gefahr einer Infektion hängt davon ab, wie die HLA-Kompatibilität des Donors und Recipients ist und ob eine T-Zell Depletion des Donors vorgenommen wurde (Einsele et al., 2001).

Bei autologen Transplantationen ist das Risiko einer Infektion sehr viel niedriger als bei einer allogenen Stammzelltransplantation. Letztere haben ein bimodales Risiko für Aspergillusinfektionen (Wald et al., 1997; Martino et al., 2002). Zum einen kann eine invasive Aspergillose in der frühen neutropenischen Phase nach der Transplantation auftreten, zum anderen besteht weiterhin ein Risiko nach dem Engraftment aufgrund der anhaltenden Immunsuppression (Thursky et al., 2004).

Verlängerte Neutropeniephasen erhöhen deutlich die Gefahr einer invasiven Aspergillose (Skladny et al., 1999; Martino et al., 2002).

Daneben kommt auch der Form der Vorbehandlung, dem Alter, der Unterbringung des Patienten in einem Hochfiltrerraum, einer vorbestehenden IA und möglichen Komplikationen, wie z.B. eine GvHD, eine wesentliche Bedeutung zu (Einsele et al., 2003; Marr et al., 2002a; Wald et al., 1998; Martino et al., 2002).



## **1.4 Diagnostik**

Die Diagnostik der invasiven Aspergillosen ist insgesamt sehr mühselig und wird durch die unspezifischen klinischen Symptome erschwert. Trotz vieler Fortschritte in der Diagnostik, gibt es bis heute noch keine gesicherte, einfach durchführbare Methode, die dies ermöglicht.

So werden viele Fälle zu spät erkannt und behandelt, wodurch die Prognose verschlechtert wird (Skladny et al., 1999).

Zum Nachweis von Aspergillen wurden Mikroskopie, Histologie, Kultur, Pilzantigen- und Antikörpernachweis sowie DNA-Nachweis mittels molekularbiologischer Methoden verwendet.

Auch bildgebende Verfahren können auf eine Infektion hindeuten.

Den sicheren Beweis für eine Aspergillose liefert allein der Erregernachweis in einer Histologie oder Kultur (Ascioglu et al., 2002; Spiess et al., 2003; Skladny et al., 1999).

### **1.4.1 Histologie/ Cytologie/ Mikroskopie**

Um die sichere Diagnose einer IA zu stellen, ist die Histologie die Methode der Wahl (Gulbahce et al., 2004).

Eine einfache schnelle Methode, um Aspergillen zu entdecken, ist die Mikroskopie von verdächtigem Material. Dabei ist es sehr wichtig, dass das Material unter sterilen Bedingungen abgenommen wird, damit Kontaminationen möglichst ausgeschlossen werden können. Oftmals ist es nicht möglich, zwischen einer Kontamination, Besiedlung oder Invasivität zu unterscheiden (Einsele et al., 2000).

Als Untersuchungsmaterial werden Gewebs- und Abstrichpräparate entnommen.

Flüssigkeitsproben von Blut, Liquor und anderen Körperflüssigkeiten können ebenso benutzt werden.

Bei der Mikroskopie können 7-10 µm große Hyphen mit septiertem Myzel beobachtet werden. Diese weisen eine dichotome Verzweigung auf und liegen

radiär in Kolonien. Sie können deutlich mithilfe von Grocott- und PAS- Färbung dargestellt werden (Ruhnke et al., 2003)

Invasive Methoden wie Bronchoskopie und Biopsie sind oft bei schwer kranken Patienten kontraindiziert und daher für die Diagnosestellung ausgeschlossen (Hebart et al., 2000a; Stevens, 2002).

### **1.4.2 Kultur**

Aspergillen lassen sich auf den üblichen Nährmedien innerhalb von 2-4 Tagen anzüchten (Einsele et al., 2000). Spezifität und Sensivität dieser Methode sind eher gering (Loeffler et al., 1997).

Für die Anzucht Biopsiematerial, Abstrichmaterial, Liquor, BAL, Sputum und auch Blut verwendet.

Im Falle der Blutkultur besteht das Problem, dass die Anzucht von Aspergillen meist nicht gelingt und somit die Diagnose falsch negativ ausfällt (Einsele et al., 1997, Loeffler et al., 2002b)

### **1.4.3 Bildgebende Verfahren**

Radiologische Verfahren, wie das konventionelle Röntgen und die HRCT, liefern frühzeitig charakteristische Hinweise auf eine Aspergillose (Caillot et al., 1997; Kami et al., 2001). Dennoch müssen die Befunde im Gesamtzusammenhang und im Kontext klinischer Symptome, dem Ansprechen auf Therapie und anderen diagnostischen Befunden gesehen werden. Denn auch bei den bildgebenden Verfahren ist die Spezifität relativ gering.

Richtungsweisend sind im radiologischen Befund fleckige oder noduläre Infiltrate. Häufig weisen diese ein zuführendes Gefäß auf und liegen pleuranah.

Infolge einer Einblutung oder Entzündung entsteht ein Randsaum, der als Haloefekt bezeichnet wird.

Bei der Rekonstitution kann es zu Einschmelzungen und Kavernenbildungen kommen. Innerhalb der Kavernen entstehen manchmal bewegliche Mycetome. Im HRCT, manchmal auch im konventionellen Röntgenbild, können diese abgekapselten Pilzbälle als Luftsichelzeichen beziehungsweise als air crescent sign beobachtet werden (Kami et al., 2001; Gefter et al., 1985; Ruhnke et al., 2003).

Das air crescent sign ist ein relativ spezifisches Zeichen, das aber erst in der Spätphase der Erkrankung erkannt wird.

In vielen Fällen sind diese Veränderungen nicht in der konventionellen Röntgenaufnahme sichtbar (Einsele et al., 2001; Denning, 1998). Dann sollte eine HRCT oder MRT hinzugezogen werden.

#### **1.4.4 Antigennachweis**

Der serologische Antigennachweis ist eine geeignete Methode zur Früherkennung der IA. Da die Antigene diskontinuierlich ins Blut ausgeschüttet werden, sollte diese Methode mindestens 2 x pro Woche durchgeführt werden (Stevens, 2002; Hahn et al., 2001).

Eine Methode mit hoher Sensivität ist ein Enzymimmuntest (ELISA), der zirkulierendes Galaktomannan aus der Zellwand von *Aspergillus fumigatus* mit Hilfe eines mononuklearen Antikörpers nachweist (Costa et al., 2002; Alexander, 2002; Mennik-Kersten et al., 2004; Bretagne, 2003; Maertens et al., 1999; Rantakokko-Jalava et al., 2003). Dieses Nachweisverfahren ist aber mit einer hohen falsch positiven Rate zwischen 10% und 15% behaftet (Costa et al., 2002).

Andere angewandte Methoden sind der Latex-Agglutinationstest und die (1--3)- $\beta$ -D-Glucanmessung (Kami et al., 2001; Kawazu et al., 2004).

### **1.4.5 Antikörpernachweis**

Ein Antikörpernachweis fällt oft bei neutropenischen Patienten aufgrund einer verzögerten Immunreaktion schwer (Golbang et al., 1999; Van Burik et al., 1998b).

Wenn bei diesen Patienten jedoch Aspergillusantikörper entdeckt werden, weist das häufig auf eine Verbesserung des Immunsystems und somit auf eine bessere Prognose hin (Latge, 1999).

Kommerziell sind verschiedene Tests wie ein indirekter Hämagglutinations-, Immunfluoreszenz- und ein ELISA-Test verfügbar.

Zur Aspergillomdiagnostik ist der Nachweis präzipitierender Antikörper mittels Ouchterlony-Technik oder Gegenstromelektrophorese eine geeignete Methode, die sich aber bei einer IA nicht bewährt hat (Ruhnke et al., 2003).

Insgesamt ist der Antikörpernachweis bei immunsupprimierten Patienten eine wenig hilfreiche Methode zur Frühdiagnostik der invasiven Aspergillose (Stevens, 2002).

### **1.4.6 DNA-Nachweis mittels PCR**

Neuere viel versprechende Methoden sind verschiedene PCR-Verfahren (Loeffler et al., 2002a; Lass-Floerl., 2001; Williamson et al., 1999). Bei diesen wird eine bestimmte Genregion amplifiziert und mit Hilfe geeigneter Primerpaare bestimmt.

Diese Region ist bei Panfugal-PCR zum Beispiel im 18SrRNA, einer hochkonservierten Multicopygenregion (Loeffler et al., 1998; Skladny et al., 1999), oder im mitochondrialen DNA-Bereich (Spiess et al., 2003) gelegen.

Fortgeschrittene PCR-ELISA-Techniken (Loeffler et al., 1998), die TaqMan-Technologie (Reiss et al., 1998; Bretagne, 2003; Costa et al., 2001) und das LightCycler®-System (Loeffler et al., 1999; Costa et al., 2002; Imhof et al., 2003; Pryce et al., 2003; Spiess et al., 2003) haben schon zu relativ guten und schnellen Ergebnissen geführt.

Da die Pilz-DNA diskontinuierlich ins Blut abgegeben wird, sollten auch hier mindestens zwei Proben bewertet werden (Chen et al. 2002).

## **1.5 Therapie und Prophylaxe**

### **1.5.1 Prophylaxe**

Da Aspergillen ubiquitär vorkommen und beim Patienten per Inhalation zu Infektionen führen können, ist eine Expositionsprophylaxe für Hochrisikopatienten essentiell.

Hierfür wird die Umgebung des Patienten durch Hochleistungsfilter dekontaminiert und der Patient für den Zeitraum der Immunsuppression möglichst isoliert.

Zudem ist erforderlich, dass das Personal die Hygieneregeln streng befolgt und Kittel, Handschuhe und Desinfektionsmaßnahmen verwendet.

Es sollte in Betracht gezogen werden, dass gerade Baustellen in Krankenhäusern ein großes Reservoir an Aspergillen beinhalten. Hochrisikopatienten, wie Patienten nach einer Stammzelltransplantation, sollten davon abgeschottet werden (Baddley et al., 2001).

Eine medikamentöse Prophylaxe der Aspergillose wird meist nicht durchgeführt, da der Nutzen eines solchen Unternehmens nicht gesichert ist. Da außerdem viele Patienten diese nicht benötigen, ist es fraglich, ob eine medikamentöse Prophylaxe durch ihre Toxizität nicht mehr Schaden als Nutzen einbringen würde.

Bei Patienten mit vorangegangener IA wird je nach Klinik eine Sekundärprophylaxe mit Amphotericin B oder Itraconazol vorgenommen (Ruhnke et al., 2003).

## **1.5.2 Therapie**

Da die Diagnose einer Aspergillose häufig nicht mit Sicherheit gestellt werden kann, werden empirische Therapiemöglichkeiten herangezogen (Bennett et al., 2003).

Dabei werden Patienten mit neutropenischem Fieber, das trotz Antibiotikagabe nicht gesenkt werden kann, mit Antimykotika behandelt.

Ohne Therapie verläuft die Infektion bei geschwächtem Immunsystem fast immer tödlich. Auch unter Therapie ist das Ansprechen eher gering (Subira et al., 2002).

Essentiell für die Prognose ist aber der möglichst frühe Beginn einer adäquaten Therapie (Einsele et al., 1997; Spiess et al., 2003).

Deshalb warten die meisten Kliniker die Bestätigung des Verdachts mittels Labordiagnostik nicht ab und verabreichen die Medikamente schon bei klinischem Verdacht sowie bei Nichtansprechen auf Breitbandantibiotika (Wheat, 2003).

Zur Zeit steht gegen die IA nur eine kleine Gruppe von Antimykotika zur Verfügung. Neue Bestrebungen haben zur Entdeckung neuer Stoffe geführt, deren Wirkung klinisch noch nicht gänzlich belegt worden ist.

Im Folgenden werden die verschiedenen Medikamente zur Behandlung der IA kurz beschrieben.

### **1.5.2.1 Amphotericin B**

Amphotericin B gehört zu der Gruppe der Polyen-Antimykotika. Anfang der 50er Jahre wurde es aus Kulturfiltraten der *Streptomyces nodosus* isoliert (Ruhnke, 2000).

Durch Störung der Zytoplasmamembranfunktion wirkt es fungizid, indem es an das Sterol/ Ergosterol der Pilzzellenmembran bindet und so zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Membran und konsekutiv zum Zelltod führt.

Da Amphotericin B nicht wasserlöslich ist, muss es mit Natriumdesoxycholat versetzt werden. Bei neueren, weniger toxischen Amphotericin B-Formulierungen wird die Substanz mizellar oder in Liposomen verkapselt hergestellt.

Amphotericin B hat ein breites Wirkspektrum und wirkt unter anderem gegen *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. Es ist das Mittel der Wahl bei invasiven und disseminierten Aspergillosen. Die Effizienz der Therapie ist jedoch gering (Patterson et al., 2000).

Außerdem schränken die Nebenwirkungen von Amphoptericin B-Desoxycholat die Dauer und Dosis der Anwendung ein. Akut kann es zu Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Schmerzen an der Infusionsstelle kommen.

An späteren Nebenwirkungen können Thrombophlebiten nach Infusion in eine periphere Vene, vor allem aber nephrotoxische Wirkungen wie Nierenfunktionsstörungen mit tubulärer Azidose auftreten (Dismukes, 2000).

Kontraindikationen für Amphotericin B sind schwere Leber- und Nierenfunktionsstörungen.

Die Lipidformulierungen haben prinzipiell dieselben Nebenwirkungen wie Amphotericin B, sind jedoch besser verträglich und weniger toxisch. Deshalb können bei diesen Substanzen höhere Dosierungen gewählt werden.

Aufgrund der höheren Therapiekosten werden sie aber erst bei Amphotericin B-Desoxycholat-Unverträglichkeit, bei erhöhten Kreatininwerten und bei zeitgleicher Gabe nephrotoxischer Medikamente eingesetzt (Dismukes, 2000).

### **1.5.2.2 Itraconazol**

Itraconazol ist ein Triazol-Derivat. Es wirkt über Hemmung der Ergosterolbiosynthese fungistatisch. Dabei wird die Umwandlung von Lanosterol in Ergosterol durch Inhibierung von 14- $\alpha$ -Demethylase verhindert (Ruhnke et al., 2003).

Bei dieser Substanz ist ein Monitoring angebracht, da ein bestimmter Spiegel zum therapeutischen Ansprechen notwendig ist und die Bioverfügbarkeit sehr variabel ist (Einsele et al., 2000).

Unerwünschte Wirkungen betreffen häufig den Gastrointestinaltrakt. Neben Übelkeit und Erbrechen kann es zu abdominellen Schmerzen, Opstipation und Dyspepsie kommen. Transaminasenanstieg und Überempfindlichkeitsreaktionen wurden ebenfalls berichtet.

Kontraindikationen sind Schwangerschaft und Stillzeit.

Gegenüber AmpB hat sich Itraconazol bisher in der Wirksamkeit gegen die IA nicht eindeutig behaupten können.

### **1.5.2.3 Voriconazol**

Voriconazol ist ein neues Medikament aus der Gruppe der Triazol-Derivate und hat denselben Wirkmechanismus wie Itraconazol.

Voriconazol hat ein breites Wirkspektrum mit besserer Wirksamkeit gegen *Aspergillus* spp. und weniger toxische Nebenwirkungen als Itraconazol und Amphotericin B (Baden et al., 2003; Steinbach et al., 2003; Ruhnke et al., 2003). An Nebenwirkungen wurden bisher hauptsächlich transiente Sehstörungen, Fieber, Transaminasenanstieg, Erbrechen, Exanthem und periphere Ödeme beobachtet.

### **1.5.2.4 Caspofungin**

Caspofungin ist ein neues Antimykotikum, das sich noch im Stadium der klinischen Prüfung befindet (Keating et al., 2001).

Es stammt aus der Gruppe der Echinocandine, die 1970 entdeckt wurden.

Caspofungin ist eine halbsynthetische Lipopeptidverbindung und stellt ein Derivat eines Fermentationsproduktes des Pilzes *Glarea lozoyensis* dar.



Die antimykotische Wirkung beruht auf der Synthesehemmung des  $\beta(1,3)$ -D-Glucans, einem wesentlichen Bestandteil der Pilzzellwand, dessen Verlust zur osmotischen Instabilität und Lyse der Pilzzelle führt.

An unerwünschten Arzneimittelwirkungen wurden bisher Fieber, lokale Thrombophlebitiden an der Injektionsstelle, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Flush und Bauchschmerzen berichtet.

#### **1.5.2.5 Chirurgische Resektion**

Bei abgekapselten Herden in der Lunge beziehungsweise in den anderen Organen kann ein chirurgischer Eingriff von Nutzen sein (Gow et al., 2003).

Vor allem bei Aspergillome wird eine Resektion der Herde vorgenommen.

#### **1.5.2.6 Immunmodulatoren**

Ein anderer Ansatz in der Therapie betroffener Patienten ist die Beschleunigung der hämatopoetischen Rekonstitution so wie die Verkürzung der schweren neutropenischen Phase (Einele et al., 2000).

Hier werden hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie G-CSF, GM-CSF oder steroidmobilisierende Granulozyten gegeben (Denning, 1998).

### ***1.6 Definition der invasiven Aspergillosen***

Ein wesentliches Problem bei der Therapie der invasiven Mykosen ist die erschwerte Diagnosestellung.

Durch die wenig spezifische Klinik und mühselige, nicht eindeutige Diagnostik herrscht ein ziemlich uneinheitliches Bild in den verschiedenen Kliniken in

Hinblick auf die Definition und Behandlung solcher Erkrankungen. Meist werden immunsupprimierte Patienten bei Verdacht empirisch therapiert.

Auch für die Forschung bestanden hinsichtlich der Diagnostik, keine einheitlichen Kriterien einer invasiven Aspergillose.

Zu klinisch wissenschaftlichen Zwecken wurde von der EORTC/ IFICG und NIAID/ MSG ein Konsensuskomitee einberufen, das standardisierte Definitionen der invasiven Mykosen bei immunsupprimierten krebserkrankten Patienten ausgearbeitet hat (Ascioglu et al., 2002).

Das Ergebnis ist die Definition einer neuen Klassifikation invasiver Mykosen, abhängig von dem Sicherheitsgrad der Diagnostik.

**Tabelle 1:** Die Klassifikation invasiver Aspergillosen bezogen auf die Diagnostik

<b>Kategorie der Erkrankung</b>	<b>Beschreibung</b>
Gesicherte Infektion	Histologische bzw. zytologische Untersuchung von Feinnadelbiopsie oder Biopsiegewebe ergibt positive Ergebnisse Oder positives Kulturergebnis von normalerweise sterilem Material und pathologischem radiologischen Befund
Wahrscheinliche Infektion	Wenn der Patient wenigstens eine der patientenbezogenen Risikokriterien <sup>1)</sup> erfüllt (Ascioglu et al., 2002), sowie ein mikrobiologisches <sup>2)</sup> Kriterium und ein klinisches Kriterium <sup>3)</sup>
Mögliche Infektion	Vorhanden sein müssen ein patientenbezogener Risikofaktor, ein mikrobiologisch positives Ergebnis oder ein klinisches Kriterium

- 1) Patientenbezogene Risikofaktoren:  
Neutropenie, antibiotikarefraktäres Fieber länger als 96 Stunden, vorangegangene Aspergillosen und immunsuppressive Therapie in den letzten 30 Tagen.

- 2) Mikrobiologische Kriterien:  
Positive Kultur oder Mikroskopie, Positiver Nachweis von Aspergillusantigenen in BAL oder > 2 Blutproben.
  
- 3) Klinisches Kriterium:  
Aspergillustypische radiologische Veränderungen und klinische Symptome einer Aspergillose

### **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, eine Verbesserung und Beschleunigung der Diagnostik invasiver Aspergillosen nach einer Stammzelltransplantation zu erreichen.

Da für die Prognose der invasiven Aspergillose die frühzeitige Therapie von wesentlicher Bedeutung ist, ist es entscheidend, ihre Diagnose rechtzeitig zu stellen (Von Eiff et al., 1995). Somit ist eine möglichst sichere und schnelle Diagnostik essentiell.

Im Rahmen der Aspergillosediagnostik hat der DNA-Nachweis bereits vielversprechende Ergebnisse geliefert. Diese Methoden zeichnen sich häufig durch hohe Sensitivitäten und Spezifitäten aus. Dabei wird die DNA extrahiert, mittels PCR amplifiziert und mit geeigneten Methoden detektiert.

Die Extraktion erfolgt in den meisten Labors manuell. Dies ist sehr arbeits- und zeitaufwendig. Außerdem ist bei den erforderlichen Schritten zur Handextraktion die Kontaminationsgefahr sehr hoch.

Gleichermaßen relevant ist, die Zeit der Amplifikation und Detektion zu verkürzen. In den meisten Labors erfordert dies noch mehrere Stunden.

Ein automatisiertes System zur Nukleinsäureextraktion, Amplifikation und Detektion kann dazu beitragen, menschliche Fehler zu vermeiden, die

Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern und ein standardisiertes Verfahren zu entwickeln. Dies würde eine Reduktion der Arbeitszeit und -kosten begünstigen.

Das MagNa Pure LC System ist ein vollautomatisierter Pipettierroboter, der innerhalb einer Stunde die DNA-Extraktion durchführen kann. Der Vorgang findet innerhalb des dekontaminierten, verschlossenen Gerätes statt, so dass die Kontaminationsgefahr sehr niedrig gehalten werden kann.

Zur Amplifikation und gleichzeitig zur Detektion steht ein PCR-Gerät, LightCycler®, von der Firma Roche zur Verfügung, das in 1,5 Stunden einen Erregernachweis ermöglicht.

Es arbeitet nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers und eignet sich zur qualitativen sowie quantitativen Erregerbestimmung.

In der vorliegenden Arbeit soll die automatische MagNA Pure Extraktion mit der Hand-extraktion, sowie die LightCycler®-Methode mit der konventionellen PCR-ELISA verglichen werden.

Ziel ist, ihre klinische Leistungsfähigkeit im Vergleich unter Beweis zu stellen und dadurch möglicherweise eine Methode zur Routinediagnostik zu entwickeln, die einfach, schnell und sicher angewandt werden kann.

## 2. Material, Methoden und Patienten

### 2.1 Material und Bezugsquellen

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 2:** Geräte

Geräte	Hersteller, Ort
MagNA Pure LC Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LC Carousell Centrifuge	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Zentrifugenadapter	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR- Prozessor Gene Amp 9600	Perkin Elmer, Foster City, USA
ELISA Reader Rainbow	SLT, Craisheim
ELISA Rüttler	SLT, Craisheim
Hybridisierungssofen	Bachofer, Reutlingen
Sterilbank Hersafe	Heraeus, Hanau
Vortex Mixer	Neo Lab® 7-2020
Vortex Mixer	Bachofer, Reutlingen
Vortex Genie 2TM	Bender& Hobein AG, Zürich, Schweiz
Horizontalwippe	Hofer, San Francisco
Zentrifuge Multifuge	Heraeus, Hanau

## 2.1.2 Verbrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3:** Verbrauchsgegenstände und -materialien

Gegenstände	Hersteller, Ort
MagNA Pure LC Reagent Tub (small, medium, large)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Tub Lid (small, medium, large)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure Reaction Tip (small, large)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure Sample Cartridge	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure Processing Cartridge	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Tip Stand	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Waste Bag	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit- Large Volume	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® Reaktionskapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® Kit Fast Start DNA Master Hybridisations Probes	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Primer	Roth, Karlsruhe
Hybridisierungssonden LC, FL	Timolbiol, Berlin
Lambda 705, FL	Timolbiol, Berlin
QIAmp® DNA Mini Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR- ELISA Kit (DIG- Labeling)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR- ELISA Kit (DIG- Detection)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR Mastermix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Falcon- Tubes 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Biozym, Oldendorf
Pipetten (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf
Glas Beads	SIGMA, Aldrich, Steinheim

### 2.1.3 Chemikalien

Red Cell Lysis Buffer (RCLB)  
White Cell Lysis Buffer (WCLB)  
Ethanol  
Lytikase-Puffer (5U)

Universitätsapotheke Tübingen  
Universitätsapotheke Tübingen  
Merck, Darmstadt  
Sigma, Taufkirchen

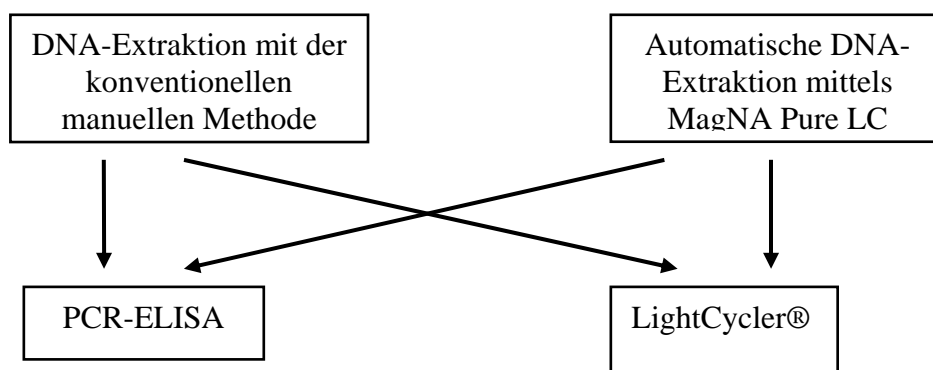
## 2.2 Methoden

Zwei verschiedene PCR-Methoden wurden hier miteinander verglichen. Dabei wurde die DNA zum einen mit der konventionellen manuellen Methode extrahiert und zum anderen mit Hilfe des automatischen MagNA Pure-Gerätes.

Diese verschieden extrahierten DNAs wurden dann jeweils einer PCR-ELISA und einer PCR mittels LightCycler® zugeführt.

Abbildung 1 stellt die verschiedenen Methoden einander gegenüber:

**Abbildung 1:**



## **2.2.1 DNA-Extraktion**

### **2.2.1.1 Manuelle DNA-Extraktion**

Um aus dem EDTA-Blut DNA zu extrahieren, wird folgendermaßen vorgegangen:

Zur Lyse von Erythrozyten werden 40 ml RCLB zum EDTA-Blut hinzugefügt, auf einer Horizontalwippe 10 min lang inkubiert, dann 10 min lang bei 1500g zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und das Pellet resuspendiert. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt.

Zur Lyse der Leukozyten wird 1 ml WCLB dem Pellet hinzugefügt, vorgetextet und 45 min bei 65°C inkubiert. Dann 10 min bei 2000g zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet resuspendiert.

Für die Generierung der Sphaeroblasten werden zum Pellet 500 µl Lytikase-Puffer (5U) zugegeben, vorgetextet und 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend 10 min bei 2500g zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet resuspendiert.

Zur Lyse der Sphaeroblasten und zur Präzipitation von Proteinen wird das Qiagen (QIAmp® DNA Mini Kit) verwendet:

Zum Pellet werden 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K hinzugefügt und 20 min bei 55°C inkubiert. Anschließend werden 200 µl AL-Puffer dazugegeben und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wird Ethanol dazugegeben, die Gesamtmenge vorgetextet und auf eine Waschsäule pipettiert, 1 min lang bei 5000g zentrifugiert.

Die Säule wird auf ein neues Auffangröhrchen gesteckt, mit 50 µl AE-Puffer versehen und mit 5000g/1 min zentrifugiert. Dabei wird die DNA von der Säulenmembran gelöst. Dieser Vorgang wird mit 9000g/1 min wiederholt.

Daraufhin ist die DNA extrahiert und steht zur weiteren Verarbeitung bereit.



### 2.2.1.2 DNA-Extraktion mit MagNA Pure LC

Eine weniger aufwendige und schnellere Methode zur DNA-Extraktion ermöglicht das MagNA Pure LC System.

Probenvorbereitung:

1 ml EDTA-Blut wird mit 35 ml RCLB-Puffer versetzt, 10 min auf einer Horizontalwippe durchmischt und 10 min bei 4000U zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet resuspendiert. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Das Pellet wird dann in ein Eppendorf-Hütchen gegeben, das zuvor mit Glas-Beads versehen wurde.

Dann wurden die Proben 1-232 eine Minute vorgetextet, die Proben 233-325 3 min. Die Lösung wurde mittels einer 1000µl Pipette von den Glas-Beads befreit und in die spezielle Probenbehälter (sample Cartridge) für die weitere Verarbeitung im MagNA Pure LC Instrument gegeben.

Vorbereitung des MagNA Pure LC Instrument:

Das Programm wird aufgerufen und die Protokollart bestimmt:

Proben 1-232 Total NA Serum, Plasma, Blood

Proben 233-325 DNA I Blood Cells High Performance

Die Volumina der Proben (200µl) und Elution (100 µl) werden festgelegt. Nachdem die Anzahl der Proben angegeben worden ist, errechnet das Programm automatisch die nötige Menge aller Reagenzien und stellt sie bildlich auf dem PC dar.

Das Instrument wird nun mit den dazugehörigen Verbrauchsmaterialien ausgestattet. Die Reagenzien aus dem Kit von der Firma Roche werden in die Reagenzienbehälter (Reagent Tub) gegeben, und das Programm kann gestartet werden.

Die Reagenzien wurden wie folgt in die Reagent Tubs eingebracht und mit dem Reagent Tub Lid verschlossen:

Proben 1-232: Magna Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit-Large Volume  
(Reihenfolge wie im Instrument)

**Tabelle 4:**

Reagenzien	Menge/ Probe
Wash Buffer I	10,8 ml
Wash Buffer III	11,0 ml
Lysis/ Binding Buffer	3,4 ml
Proteinase K <sup>1)</sup>	1,8 ml
Magnetic Glass Particles (MGP) Suspension <sup>2)</sup>	2,2 ml
Elution Buffer	1,9 ml
Wash Buffer II	5,1 ml

Proben 233-325: MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

**Tabelle 5:**

Reagenzien	Menge/ Probe
Wash Buffer I	10,8 ml
Wash Buffer II	11,0 ml
Lysis/ Binding Buffer	3,6 ml
Proteinase K	1,8 ml
MGP	2,2 ml
Elution Buffer	2,7 ml

- 1) Proteinase K muß in beiden Kits mit 5 ml Elution Buffer gelöst werden.
- 2) MGP und Proteinase K werden jeweils zuletzt pipettiert.

Die weitere Extraktion wird vom MagNA Pure LC Instrument automatisch durchgeführt.

## 2.2.2 PCR

### 2.2.2.1 Konventionelle PCR & PCR-ELISA

Die Amplifikation der extrahierten DNA wurde zunächst mit einer etablierten PCR vorgenommen. Dazu wurden jeweils 10 µl DNA 40 µl PCR-Mastermix nach folgendem Pipettierschema zugesetzt:

PCR ELISA (DIG- Labeling) Kit:

**Tabelle 6:** PCR-Mastermix

Reagenz	Konzentration/10 µl Probe
Aqua bidest.	27,2 µl
10 fach PCR-Puffer	5 µl
MgChlorid	2 µl
Dig-dNTPs	5 µl
Primer 1 und 2	0,5 ml
Taq-Polymerase	0,3 µl

**Tabelle 7:** Zusammenstezung des 10 fach Puffer für die PCR

Reagenz	Konzentration
Tris, ph 8,3	100 mM
KCL	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM

Forward Primer: Fung 1

5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG-3'

Reverse Primer: Fung 2

5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG-3'

Zum Nachweis der Pilz-DNA in ELISA wird das PCR Produkt mit Dioxygenindesoxyuracilphosphat markiert.

### **PCR ELISA (DIG Detection) Kit:**

Die Proben werden dann mit Oligonukleotiden von *A. fumigatus* hybridisiert. Diese sind mit 3' Biotin markiert:

Von den Proben werden zwei Mal 20 µl des PCR Produktes in zwei Eppendorfhütchen pipettiert. Von der Kontroll-DNA (Kit) wird eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:1, 1:10, 1:100) und jeweils 10 µl in Eppendorfhütchen gegeben.

Dann kommt in jede Probe 20 µl Denaturierungslösung. Es wird vorgetextet und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Proben werden anschließend mit 200 µl Hybridisierungslösung versehen.

### **Hybridisierungslösung:**

Sie besteht aus 200 µl Hybridisierungs-Puffer (Kit) und 2 pmol/ ml *Aspergillus fumigatus*-Oligonukleotidsonde pro Probe. Für die Kontroll-DNA 10 ml in 1ml Hybridisierungs-Puffer.

200 µl der Mixtur werden in ELISA-wells überführt und eine Schutzfolie (im Kit vorhanden) darauf angebracht.

Dann werden die Proben 3 h bei 40°C im Hybridisierungsofen auf einem Schüttler inkubiert. Nach 3 h wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl Waschpuffer (Kit) dreimal gewaschen.

Nun ist das Hybrid an der mit Streptavidin beschichteten Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert.

Jede Probe wird nun mit 200 µl Antikörperlösung (Anti-Dioxigenin-POD Konjugat) befüllt und 30 min bei 40°C auf dem Schüttler im Hybridisierungssofen inkubiert.

Die Antikörperlösung wird mindestens 1 h vorher wie folgt hergestellt:

Antikörper (Kit: anti-Dig-POD): Puffer (Kit: conjugate buffer) = 1: 100

Dann wird der Überstand wieder verworfen und das Pellet sechsmal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen.

Die Proben werden nun mit jeweils 200 µl Färbelösung versetzt und nach dem Anbringen einer Schutzfolie 30 min bei 40°C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Färbelösung sollte mindestens 30 min vorher folgendermaßen hergestellt werden:

1 ABTS. Tablette (Kit)/ 5 ml Substratpuffer (Kit)

Messung erfolgt im SLT Rainbow-Reader, bei 405 nm-Referenzfilter 492 nm.

### **2.2.2.2 PCR mit dem LightCycler®**

Eine schnellere Methode zur Durchführung der PCR bietet das Real-time PCR mittels LightCycler® Instrument der Firma Roche. Es hat zudem noch den Vorteil, dass der Amplifikationsvorgang am PC direkt verfolgt werden kann.

Es besteht die Möglichkeit einer qualitativen und quantitativen Bestimmung der Zielsequenz.

Das Prinzip der Real-time PCR mit dem LightCycler®-System beruht auf Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).

Die Sonden im Mastermix sind Oligonukleotide, die komplementär zu einem Sequenzabschnitt in der Ziel-DNA sind. Sie sind mit unterschiedlichen

Farbstoffen markiert: Eine Sonde am 3'-Ende mit dem Farbstoff Fluoreszein und die andere am 5'-Ende mit LC Red 640.

In der Anlagerungsphase lagern sich die Sonden in Abstand einer Base innerhalb der Zielsequenz auf dem Einzelstrang-DNA an. Hierbei sendet die am 3'-Ende mit Fluoreszein markierte Sonde, nach Anregung durch eine blaue interne Lichtquelle (470nm), grünes Licht. Nun wird die am 5'-Ende mit Red 640 markierte Sonde durch das grüne Licht angeregt und emittiert seinerseits rotes Licht (640nm). Dieses rote Licht wird dann vom optischen System des LightCycler® Gerätes gemessen und vom PC ausgewertet.

Am Ende des PCRs können auf dem Monitor die Ergebnisse abgelesen werden. Unter Datenanalyse kann in einer Kurve, bei der das Fluoreszenzsignal (y-Achse) gegen die Anzahl der Zyklen (x-Achse) aufgezeichnet ist, die Bewertung erkannt werden. Je höher die Konzentration der Ziel-DNA in der Probe, desto früher steigt die Kurve an.

### **Durchführung der PCR:**

In den LC Kapillaren werden 10 µl DNA und 10 µl Mastermix gegeben und bei 2000U/ min 30 sec herunterzentrifugiert und in das LightCycler®-Instrument eingebracht.

Um das Risiko einer Übertragungskontamination zu minimieren, wurde der Mastermix in einem separaten Raum unter einer extra dafür bestimmten Sterilbank zusammengesetzt.

Beim Pipettieren wurden Mundschutz, Einmalkittel und sterile Handschuhe angezogen (Loeffler et al., 2001).

**Tabelle 8:** Zusammensetzung des Mastermix

PCR Mastermix	Menge pro Probe Proben 1-97	Menge pro Probe Proben 98-207	Menge pro Probe Proben 208-299
MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl	2,7 µl	1,6 µl
H <sub>2</sub> O	2,6 µl	3,3 µl	4,2 µl
Primer 1+2	jeweils 0,5 µl	jeweils 0,5 µl	jeweils 0,5 µl
Sonde 1+2	jeweils 1,0 µl	jeweils 0,5 µl	jeweils 0,6 µl
Taqpolymerase	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl

**Tabelle 9:** Programm und Temperaturprofil

	Proben 1-207	Proben 208-325
Programm	Nik00130799hy.EXP	Nik EXP
Denaturierung	95°C :9 min	95°C :10min
Amplink	54°C :15sec	95°C :15sec
		58°C :10sec
		72°C :20sec
Zyklen	45	55

### 2.2.2.3 Ausschluß von DNA-Inhibierung

Bei 107 Proben wurde den Proben noch eine Lambda-DNA beigegeben: In die Kapillaren kommen 9,0 µl Probe, 1µl Lambda-DNA und ca. 10 µl Mastermix.

Lambda-DNA ist eine Phagen-DNA, die eingesetzt wurde, um eine Amplifikationsinhibierung ausschließen zu können.

Tabelle 10 stellt die Zusammensetzung des Mastermix dar:

**Tabelle 10:** Mastermixzusammensetzung

Mastermix	Menge pro Probe Proben 300-325	Menge pro Probe Proben 144-175
MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl	2,4 µl
Lambda Primer R+F	jeweils 0,5 µl	jeweils 0,5 µl
Pilz- Primer 1+2	1,0 µl	1,0 µl
Lambda FL+LC- Sonden	jeweils 1,0 µl	jeweils 1,0 µl
Pilz FL+LC- Sonden	jeweils 1,0 µl	jeweils 0,6 µl
Taq- Polymerase	2,0 µl	2,0 µl

Lambda 705: 5'- LC Red705-CggATATTTTgATCTgACCGAAgCg--PH

Lambda FL: 5'-ggTgCCgTTC ACTTCCCgAATAAC--FL

Aspergillus fumigatus LC:

5'- LC Red 640- TgAggTTCCCCAgAAggAAAggTCCAgC--H

Aspergillus fumigatus FL :

5'-gTTCCCCCACA gCCAgTgAAggC--FL

#### 2.2.2.4 Variationen der Probenkonzentration im Mastermix

28 Proben wurden jeweils im Verhältnis 1 :10 und 1 : 100 verdünnt und dem Mastermix zugegeben.

Dann wurden sie ins LightCycler(R)-Instrument eingebracht und bewertet.



### **2.2.2.5 Kontaminationsmonitoring**

Um sicher zu gehen, dass das Versuchsergebnis nicht durch Kontamination verfälscht wurde, wurde bei jedem Durchgang eine Negativprobe, bestehend aus 10 µl destilliertem Wasser und 10 µl Mastermix, mitgeführt.

### **2.2.2.6 Positivkontrolle**

Als Positivkontrolle wurde bei jedem Durchgang eine Aspergillusverdünnungsreihe ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ) mitgeführt.

Die Aspergillus-DNA war zuvor im MagNA Pure extrahiert worden. Zur Vorbereitung wurde sie wie die Blutproben 1 Minute bzw. 3 Minuten lang mit Glass-Beads vorgetextet.

### **2.2.2.7 Statistische Analyse**

Zur statistischen Analyse wurde die Signifikanz mittels Chi-Square und Fishers exact-Test ausgewertet.

Die P-Werte wurden mithilfe des Softwareprogramms Sigma Stat Test, Version 2.0 von SPSS Inc. Microsoft München berechnet.

## 2.3 Patienten

Von insgesamt 55 Patienten wurde im Zeitraum von 17.02.2003 bis 24.11.2003 zwischen 1 bis 23 Mal EDTA-Blut abgenommen und, wie bereits berichtet, bearbeitet.

Die Patienten waren in diesem Zeitraum auf der Station und wurden ausgesucht, da sie durch eine Immunsuppression nach einer PBSCT beziehungsweise Chemo- und Strahlentherapie ein hohes Risiko für eine Infektion an Asperillen aufzeigten.

37 Männer und 18 Frauen wurden in dieser Studie aufgenommen. Das mittlere Alter betrug 43,07. Der älteste Patient war 68, der jüngste 19 Jahre alt.

28 Patienten wurden einer familiären PBSCT und 21 Patienten einer fremdallogenen PBSCT unterzogen. 4 Patienten waren zur Chemotherapie auf Station, und 2 weitere Patienten waren aufgrund von Komplikationen, die GvHD und Infektionen beinhalteten, in Behandlung.

Tabelle 11 zeigt die Verteilung der Grundkrankheiten:

**Tabelle 11:**

Grunderkrankung	Anzahl der Patienten
AML	19
NHL	9
CML	8
ALL	6
Plasmazytom	6
MDS	3
Osteomyelofibrose	1
Aplastisches Syndrom	1
M. Hodgkin	1
Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	1

In dieser Zeit entwickelten 24 Patienten aspergillusverdächtige pulmonale Infiltrate.

Antimykotische, aspergilluswirksame Prophylaxe beziehungsweise Behandlung bekamen 32 Patienten.

Von den 55 Patienten verstarben 15 bis zum Ende dieser Studie.

Die Patienten wurden nach der Einteilung von EORTC (Ascioglu et al., 2002) in 4 Gruppen eingeteilt:

31 Patienten erfüllten nicht die Kriterien dieser Einteilung und zeigten somit keinen klinischen Anhalt für eine Aspergillusinfektion. 155 Proben stammten von dieser Gruppe.

19 Patienten erfüllten die Kriterien einer möglichen (possible) Aspergillose. Dies betraf 127 der Blutproben.

17 dieser Patienten hatten pulmonale pilzverdächtige Infiltrate, und bei 11 Patienten trat Fieber auf. 16 Patienten bekamen antimykotische Therapie. Sichere Zeichen einer invasiven Aspergillose konnte bei diesen Patienten nicht nachgewiesen werden. 8 der Patienten verstarben im Laufe der Studie.

Bei 2 Patienten ließ sich eine gesicherte Aspergillose nachweisen.

3 Patienten konnten der Gruppe mit den wahrscheinlichen Aspergillosefällen zugeordnet werden.

Tabelle 12 stellt die Daten der 2 Patienten mit einer sicheren (proven) und den 3 Patienten mit einer wahrscheinlichen (probable) Aspergillose dar:

**Tabelle 12:** Patientendaten, geordnet nach den EORTC-Kriterien, proven und probable

Patienten- nummer Alter Geschlecht	Grund- erkrank- ung Prognose	Klinische Daten und klinische Kriterien der Einteilung nach EORTC/ Konsensus  Antimykotische Therapie bzw. Prophylaxe	Pro- ben- zahl
2 Patienten mit sicherer Aspergillose:			
29). 29 Jahre weiblich	NHL  Exitus	-syngene PBSCT -Chemotherapie u.a. mit Rituximab -Fieber in der Aplasie,Dyspnoe -radiologisch Totalatektase der linken Lunge -Bronchoskopie mit Gewebsbiopsie ergab nekrotisches Material und große Mengen an Aspergillen -Breite antimykotische Behandlung	4
48). 51 Jahre weiblich	Plasma- zytom; Entlas- sung	-fremdallogene PBSCT -hohes antibiotikaresistentes Fieber -GvHDIII° -Steroide -CMV-Reaktivierung -Aspergillusantigennachweis -aspergillustypische pulmonale Infiltrate -Aspergillen im Abszessabstrich am linken Oberarm -Aspergillen in der Augenhöhle nach Eukleation -Rhinitis, Sinusitis -Ambisome, Caspofungin	7

3 Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose:			
15). 47 Jahre männlich	Aplas- tisches Syndrom; Spindezel- liges Lymphom Exitus	-familiär allogene PBSCT, CD 34 selektioniert -GvHD -Steroide, Infliximab - vorbestehende pulmonale Aspergillose -Nachweis von Aspergillen in BAL -pulmonale pilztypische Infiltrate -Ambisome, Voriconazol	15
21). 41 Jahre männlich	AML  Entlas- sung	-Z.n. fremdallogene PBSCT -Z.n. kulturell gesicherte pulmonale Aspergillose -Z.n. Pansinusitis - pulmonale pilztypische Infiltrate -Fieber -Verdacht auf CMV-Reaktivierung -Nachweis von Aspergillen in BAL -Voriconazol	3
30). 52 Jahre weiblich	NHL  Reha	-familiär allogene PBSCT - GvHD, Kortikosteroide -Fieber in der Aplasie ohne Erregernachweis -pilzverdächtige pulmonale Infiltrate -mehrfacher Nachweis von Aspergillusantigenen -Caspofungin, Voriconazol, Diflucan	14

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Darstellung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der verschiedenen Materialien

Insgesamt wurden 352 EDTA-Blutproben von 55 Patienten zwischen Februar und Dezember 2003 untersucht.

Diese wurden nach einer automatischen DNA-Extraktion mittels MagNaPure beziehungsweise nach einer manuellen DNA-Extraktion einer PCR-ELISA und einer PCR mittels LightCycler® unterzogen.

##### 3.1.1 Darstellung der positiven Ergebnisse

**Tabelle 13:** Darstellung der positiven Ergebnisse

	LightCycler®	PCR-ELISA
MagNa Pure	Negativ	77 positive (23,7%)
Manuelle DNA-Extraktion	Negativ	62 positive (19,1%)
Übereinstimmungen	Alle	9 (2,8%)

## 3.2 Ergebnisse der PCR- ELISA

### 3.2.1 Ergebnisermittlung mittels PCR-ELISA

Zur Bewertung eines Ergebnisses bei der PCR-ELISA wird bei jedem Lauf ein cut-off Wert berechnet. Dieser ergibt sich aus dem dreifachen OD-Wert des Durchschnittes aller Negativkontrollen.

Eine Probe wird dann als positiv bewertet, wenn ihr Ergebnis über dem ermittelten cut-off Wert liegt.

### 3.2.2 Ergebnisse PCR-ELISA

Bei der manuellen Extraktion ergaben 62 Proben ein positives Ergebnis. 263 Proben blieben negativ.

Mit der automatischen MagNa Pure-Extraktion waren 77 Proben positiv und 248 Proben hatten ein negatives Ergebnis.

Von den positiven Ergebnissen der unterschiedlichen Extraktionsmethoden stimmten 9 Proben überein.

**Tabelle 14:** Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit des Extraktionsmodus

MagNa Pure	positiv	negativ
Manuelle Extraktion		
positiv	9 (2,8%)	53 (16,3%)
negativ	68 (20,9%)	195 (60%)

$P(\text{Chi}^2) = 0,085$

### 3.2.3 Tabellarische Darstellung der Proben mit Übereinstimmung der positiven Ergebnisse bei der manuellen sowie bei der automatischen MagNa Pure Extraktion

**Tabelle 15:** Übereinstimmung der positiven Ergebnisse

Patientennummer	Einteilung nach EORTC/NIAID	Grund-erkrankung	Anzahl der übereinstimmenden Proben	Anti-mykotika	Prognose
2	possible	AML	1	Voriconazol	Exitus
3	keine	CML	1	Voriconazol	Entlassung
15	Probable	Aplastisches Syndrom	1	Voriconazol Ambisome	Exitus
28	keine	AML	1	Difulcan	Entlassung
30	probable	NHL	1	Caspofungin Voriconazol	REHA
33	keine	Osteomyelofibrose	2	Difulcan	Genesung
37	keine	CML	1	keine	Entlassung
38	possible	ALL	1	Voriconazol	Regression



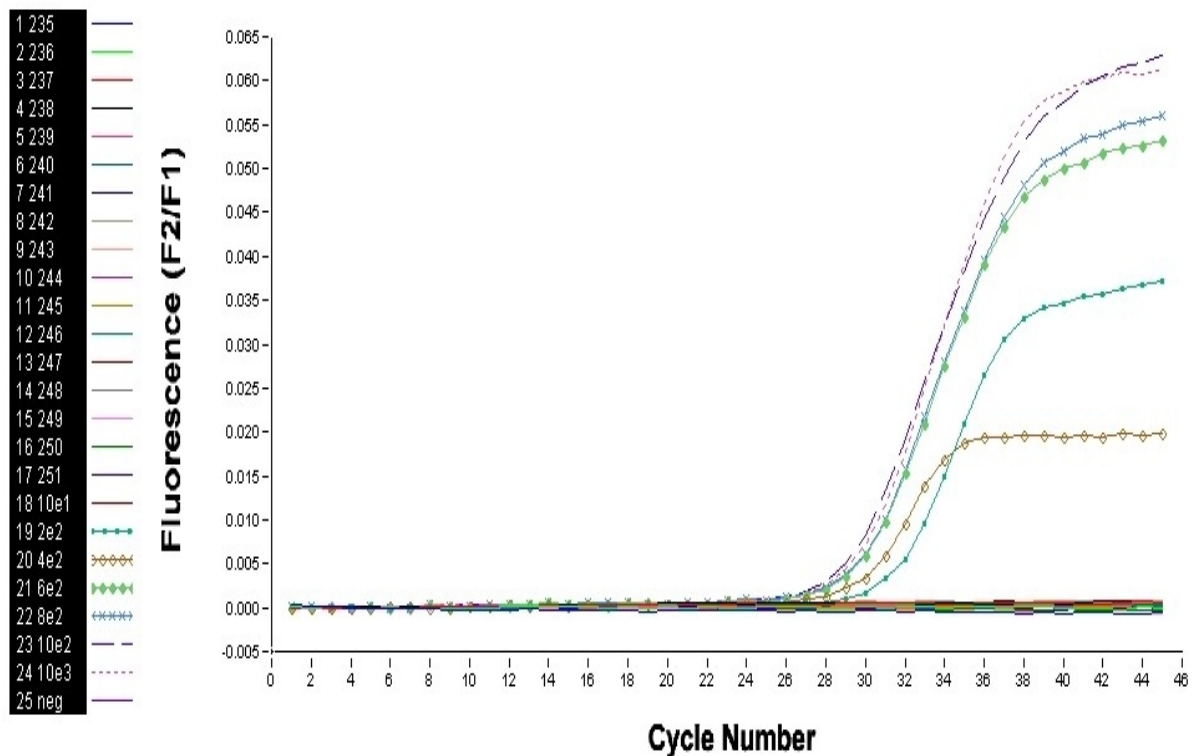
### 3.3 Ergebnisse des LightCycler®

#### 3.3.1 Ergebnisermittlung mittels LightCycler®

Beim LightCycler® wird das Ergebnis in Form einer Kurve dargestellt. Dabei ist der Fluoreszenzanstieg (y-Achse) während der Zyklen (x-Achse) aufgezeichnet. Auch die DNA-Konzentration jeder Probe kann durch den Zeitpunkt des Kurvenanstiegs berechnet werden, da sie miteinander korrelieren.

Abbildung 2 zeigt exemplarisch die Grafik eines solchen LightCycler-Laufes

Abbildung 2:



Nummer 1 bis 17 sind Patientenproben, die alle negativ bleiben. Nummer 18 bis 24 sind Positivkontrollen, welche alle bis auf 10 positiv werden. Die Negativkontrolle, Nummer 25, bleibt negativ.

### **3.3.2 Ergebnisse LightCycler®**

Unabhängig von der Art der DNA-Extraktion waren alle 325 Proben beim LightCycler® negativ.

Die Negativkontrollen blieben immer negativ. Die Positivkontrollen wurden mit einer Sensivität von zwischen  $10^1$ - $10^2$  immer vom LightCyclergerät als positiv ermittelt.

### **3.3.3 Ausschluß der Inhibierung**

Um eine Amplifikationsinhibierung ausschließen zu können, wurde eine Phagen-DNA, die Lambda-DNA, einigen Proben bei der LightCycler®-PCR beigegeben.

Dies war bei 76 Proben mit MagNa Pure-Extraktion und bei 31 Proben mit der konventionellen Handextraktion der Fall.

In allen Fällen detektierte der LightCycler die Lambda-DNA, und eine DNA-Inhibierung konnte ausgeschlossen werden.

### **3.3.4 Variationen der Methoden**

#### **3.3.4.1 Variationen der DNA-Extraktion mittels PCR**

Um auszuschliessen, ob die Extraktion die Ergebnisse beeinflusst, wurden die Proben 1-232 mit der MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit-Large volume bearbeitet.

Die Proben 233-325 wurden mit der MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I vorbereitet.

Dies beeinflusste aber die Ergebnisse nicht. Die LightCycler® Ergebnisse blieben negativ.

### **3.3.4.2 Variationen der Konzentrationen im Mastermix**

Eine Änderung der Konzentrationen von MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, Primern und Sonden (siehe Tabelle 8 im Materialteil) ergab auch keine positiven Ergebnisse mit dem LightCycler®.

### **3.3.4.3 Verdünnung der Proben**

Es wurde versucht, durch eine Verdünnung (1:10 und 1:100) von 28 Proben im Mastermix die Ergebnisse zu beeinflussen. Diese waren beim PCR-ELISA positiv detektiert worden.

Auch hier ließen sich keine positiven Ergebnisse durch den LightCycler® verzeichnen.

## ***3.4 Darstellung der Ergebnisse in Bezug auf die verschiedenen Patientengruppen***

### **3.4.1 Patienten mit sicherer Aspergillose nach der EORTC-Einteilung**

Die sichere Diagnose einer Aspergillose konnte zwei Patientinnen zugeordnet werden. Dies war bei den Patienten Nummer 29 und Nummer 48 der Fall.

11 Proben stammten von diesen Patientinnen.

Nummer 29:

Bei der 29-jährigen Patientin mit NHL war eine Lungenbiopsie entnommen worden, welche reichlich Aspergillen enthielt.

Zudem hatte sie Fieber in der Asplasie nach einer syngenen PBSCT und litt unter Dyspnoe.

4 Blutproben wurden ihr entnommen. Eine dieser Proben war nach der automatischen MagNa Pure DNA-Extraktion mit dem ELISA positiv detektiert worden.

Der Rest der Proben verblieb negativ.

Nummer 48:

Bei der 51-jährigen Patientin mit Plasmazytom war nach der fremdallogenen PBSCT hohes antibiotikaresistentes Fieber mit Rhinitis und Sinusitis aufgetreten.

Im CT-Thorax wurden aspergillustypische Infiltrate entdeckt.

Im Laufe der Erkrankung wurde später bei einem Abszessabstrich am linken Oberarm und in der linken Augenhöhle nach einer Eukleation Aspergillen entdeckt.

Von dieser Patientin lagen 7 Proben vor. 5 Proben ergaben negative Ergebnisse.

Zwei Proben, die zu einem späteren Zeitpunkt als die negativen 5 Proben und zeitgleich mit den beginnenden pulmonalen Infiltraten entnommen waren, ergaben nach der MagNa Pure-Methode positive Ergebnisse.

Vom LightCycler® wurden keine dieser positiven Proben erkannt.

**Tabelle 16:** Ergebnisse der beiden Patientinnen

MagNa Pure	Positiv	negativ
PCR-ELISA		
Positiv	Keine	keine
Negativ	3 (27,3%)	8 (72,7%)

P(Fisher exact)= 1,000

### 3.4.2 Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose nach der EORTC-Einteilung

Von den 55 Patienten erfüllten 3 Patienten die Kriterien der wahrscheinlichen Diagnose der invasiven Aspergillose nach der Einteilung der EORTC/ NIAID.

Tabelle 17 zeigt die Daten dieser beiden Patienten

**Tabelle 17:** Patienten mit wahrscheinlicher IA

Patienten-nummer	Anzahl der Proben	negative Ergebnisse	positive mit der MagNa Pure-Methode	positive mit der manuellen DNA-Extraktion	Übereinstimmend positiv
21	3	2	keine	1	keine
30	14	8	3	2	1
15	15	12	1	1	1

Ingesamt waren es 32 (9,8 %) Proben mit 4 positiven Ergebnissen bei der manuellen DNA-Extraktion, 4 positive Ergebnisse bei der MP-Extraktion, zwei Proben mit positivem Ergebnis mit beiden Methoden und 22 negative Ergebnisse. Tabelle 18 stellt diese Ergebnisse dar:

**Tabelle 18:** Positive Ergebnisse in Abhängigkeit von Extraktionsmodus

MagNa Pure	Positiv	negativ
PCR-ELISA		
Positiv	2 (6,3 %)	4 (12,5 %)
Negativ	4 (12,5 %)	22 (68,8 %)

P(Fisher exact)=0,310

### 3.4.3 Darstellung der Ergebnisse der Patienten mit möglicher Aspergillose

19 Patienten erfüllten die Kriterien einer möglichen invasiven Aspergillose.  
127 (39,1 %) Proben stammten von diesen Patienten.

Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse dieser Proben:

**Tabelle 19:** Ergebnisse der Patienten mit möglicher Aspergillose

MagNa Pure	Positiv	negativ
PCR-ELISA		
Positiv	2 (1,6 %)	19 (15%)
Negativ	27 (21,3 %)	79 (62,2 %)

$P(\text{Chi}^2)=0,192$

Von diesen 19 Patienten wurde bei 6 Patienten nur eine einzige Probe und bei einem Patienten 2 Blutproben abgenommen und untersucht.

Da bei diesen Probenergebnissen kein Verlauf zu erkennen ist, sind hier keine Aussagen möglich. Deshalb sind sie bei folgender Auswertung ausgeschlossen worden.

Die Proben mit positivem Ergebnis wurden nicht ausgeschlossen.

Es blieben 13 Patienten mit 120 Proben zur Auswertung übrig.

Tabelle 20 stellt die Ergebnisse dieser Auswertung dar:

**Tabelle 20:** Ergebnisse der Patienten mit 3 oder mehr Proben im Verlauf, bzw. mit positivem Ergebnis

MagNa Pure	Positiv	negativ
PCR-ELISA		
Positiv	2 (1,7%)	19 (15,8 %)
Negativ	27 (22,5%)	72 (60 %)

$P(\text{Chi}^2)=0,148$

#### 3.4.4 Patienten ohne Anhalt für eine invasive Aspergillose

31 Patienten konnten nach den Kriterien der EORTC keiner der drei vorgegebenen Gruppen, possible, probable, proven, zugeordnet werden.

155 Blutproben stammten von diesen Patienten.

Tabelle 21 stellt Ergebnisse dieser Patientengruppe dar:

**Tabelle 21:** Ergebnisse der Patienten ohne Anhalt für eine Infektion

MagNa Pure	Positiv	negativ
PCR-ELISA		
Positiv	5 (3,2%)	30 (19,4 %)
Negativ	34 (21,9%)	86 (55,5 %)

$P(\text{Chi}^2)=0,143$

Wenn man, wie oben beschrieben, die Patienten mit weniger als 3 Proben weglässt, kommen folgende Ergebnisse zustande:

22 Patienten und 145 Proben verbleiben.

**Tabelle 22:** Ergebnisse der Patienten mit mehr als 3 Proben bzw. mit positiven Ergebnissen

MagNa Pure	Positiv	negativ
PCR-ELISA		
Positiv	5 (3,4%)	30 (20,7%)
Negativ	34 (23,4%)	76 (52,4%)

$P(\text{Chi}^2)=0,087$

### 3.4.5 Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die statistische Auswertung mit der Vierfeldertafel, Chi-Square und Fishers exakter Test, ergab keine signifikanten P-Werte.



## 4. Diskussion

### 4.1 *Stand der Forschung*

Fortschritte in der Medizin haben in den letzten Jahrzehnten erheblich dazu beigetragen, neue Behandlungsstrategien und -methoden zu entwickeln.

Dies brachte jedoch auch neue Probleme mit sich. So nimmt die Anzahl immunsupprimierter Patienten mit der Folge ansteigender Komplikationen immer mehr zu (Loeffler et al., 2001).

Bei hämatologischen Erkrankungen zum Beispiel gibt es neue Methoden der Chemo- und Radiotherapie, so wie Stammzelltransplantation, die immer schwerere und länger dauernde Neutropenien auslösen.

Vor allem Infektionskrankheiten spielen als Ursachen von Morbidität und Mortalität eine entscheidende Rolle (Hebart et al., 2004).

Durch die breite antibiotische Prophylaxe sind es besonders Pilze, die mit steigender Inzidenz in den letzten Jahren immunkomprimierte Patienten infizieren (Van Burik et al., 1998b).

Seit der Einführung der Fluconazolprophylaxe vor allem gegen Candidaspezies bereiten vor allem Aspergillen dem Immunsupprimierten große Probleme (Fukuda et al., 2003; Marr et al., 2002b).

Aspergillusinfektionen gehen mit hohen Mortalitätsraten einher und sind schwer zu diagnostizieren (Tang et al., 1993; Hebart et al., 2002; Braedel et al., 2004).

Klinisch fällt eine Infektion mit Aspergillen bei neutropenischen Patienten oft nicht auf (Stevens, 2002). Zudem sind die Symptome unspezifisch (Hebart et al., 2000a).

Eine Prophylaxe gegen Aspergillen ist wenig effektiv und wird daher meist nicht durchgeführt (Skladny et al., 1999; Baddley et al., 2001; Latge, 1999).

Außerdem ist es fraglich, ob durch den prophylaktischen Einsatz der sehr toxischen und teuren Medikamente nicht mehr Schaden als Nutzen anrichtet wird.

Für die Prognose der invasiven Aspergillosen ist die rechtzeitige Diagnostik und bald möglicher Beginn der antifungalen Therapie essentiell (Aisner et al., 1977; Muller et al., 2002).

#### **4.1.1 Diagnoseschwierigkeiten**

Wegen der unspezifischen Symptome ist für die Diagnose invasiver Aspergillosen die Kombination mehrerer Diagnosemethoden erforderlich.

Die sichere Diagnose einer Aspergillose kann bis heute nur durch histologischen, mikroskopischen, oder kulturellen Beweis von Aspergillen im steril entnommenen Gewebe gestellt werden (Ascioglu et al., 2002).

Eine Gewebentnahme ist aber häufig den schwer erkrankten Patienten nicht zumutbar (Sanguinetti et al., 2003).

Nichtinvasive, einfache und schnelle Methoden mit ausreichend hoher Sensitivität und Spezifität gibt es bisher nicht, so dass die Diagnose häufig zu spät oder gar nicht gestellt wird (Skladny et al., 1999; Raad et al., 2002).

#### **4.1.2 Detektion von Aspergillen mittels PCR**

Eine nichtinvasive Methode, Krankheitserreger bei Patienten nachzuweisen, ist die PCR. Dabei werden Genabschnitte amplifiziert und mit geeigneten Methoden detektiert.

Diese Methode spielt schon in verschiedenen Bereichen der Medizin eine entscheidende Rolle.

Auch im Rahmen der Pilzdiagnostik wurden verschiedene PCR-Methoden etabliert und ihre klinische Anwendbarkeit belegt (Einsele et al., 1997; Hebart et al., 2000b; Ferns et al., 2002).

Es gibt verschiedene Ansätze mit bestimmten Primern beziehungsweise Sonden, die an pilzspezifische Genregionen binden (Van Burik et al., 1998b).

Unterschiedliche Genabschnitte wurden bisher dazu eingesetzt, so zum Beispiel ribosomale und mitochondriale Regionen (Rantakokko-Jalava et al., 2003; Costa et al., 2001).

Dabei sind Gensequenzen mit hoher Spezifität anwendbar, die sich aber häufig durch geringere Sensitivität als panfungale Primer auszeichnen.

Es können universelle Primer für hoch konservierte Sequenzen, die multi-copy-Gene eingesetzt werden. Mit diesen Primern werden viele verschiedene Pilzspezies erkannt. Dies bringt eine hohe Sensitivität mit sich (Chen et al., 2002).

Die Spezifität kann dann durch den Einsatz speziesspezifischer Sonden erreicht werden (Stevens, 2002).

Die bei dieser Arbeit benützte Gensequenz ist das multi-copy-Gen, 18S rRNA . Hohe Sensitivitäten und Spezifitäten sind in diesem Genbereich berichtet worden (Einsele et al., 1997; Lass-Floerl et al., 2001).

Die PCR ist bis heute nicht ohne weiteres als sicheres Diagnosekriterium anwendbar.

Es gibt hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität unterschiedliche Ergebnisse und Aussagen der bisher unternommenen Studien (Cost et al., 2002; Bretagne, 2003).

Die eingesetzten Techniken sind weder einheitlich noch standardisiert. So werden in den verschiedenen Labors völlig unterschiedliche hauseigene Methoden angewandt. Daher ist auch der Vergleich der Aussagen kaum möglich.

Verschiedene PCR-Methoden haben bis heute ihre Anwendbarkeit unter Beweis gestellt, so die Amplifikatsdetektion mittels Gelelektrophorese oder Southern Blot, nested PCR, PCR-ELISA und seit einigen Jahren auch die Real-time-PCR (Heid et al., 1996).

Besonders hohe Sensitivitäten und Spezifitäten haben sich bei der nested PCR feststellen lassen (Yamakami et al., 1996; Williamson et al., 2000; Kawamura et al., 1999).

Gelelektrophoresen sind in ca. 2,5 Stunden durchführbar. Sie sind aber nicht so sensitiv wie die anderen Methoden. Da universelle Primer eingesetzt werden, ist eine Differenzierung der verschiedenen Pilze allein mit dieser Methode nicht möglich.

Southern-Blot hat zwar höhere Sensitivitäten und Spezifitäten als die Gelelektrophorese, bedeutet aber einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand von ca. 10 Stunden.

Verschiedene PCR-ELISA-Verfahren wurden eingeführt. Eine geeignete Methode ist die, bei der das Amplifikat während der PCR mit Dioxigenin markiert und mit geeigneten Sonden nachgewiesen wird. Beim ELISA bindet die Oligonucleotidsonde über Biotin an die Mikrotiterplatte (Loeffler et al., 1998). Das immobilisierte Substrat wird nun mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

#### **4.1.3 Vergleich PCR-ELISA versus Real-time-PCR mit dem LightCycler®**

Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit waren zwei verschiedene PCR-Methoden, die im Labor verwendet werden, um sie miteinander zu vergleichen.

Eine Methode ist die schon vielfach untersuchte PCR-ELISA Technik (Loeffler et al., 1998; Lass-Flörl et al., 2001).

Die zweite Methode ist die LightCycler®-PCR. Sie ist eine Real-time PCR, die den Vorteil hat, DNA qualitativ und quantitativ zu bestimmen (Bretagne, 2003).

Die Quantifizierung würde die Bestimmung der Pilzlast erlauben; somit wäre ein therapeutisches Monitoring möglich (Spiess et al., 2003).

Die erkannte DNA-Menge könnte auch möglicherweise Aufschluss darauf geben, ob es sich um eine Kontamination, Kolonisation oder Infektion handelt (Buchheidt et al., 2004; Spiess et al., 2003; Sanguinetti et al., 2003).

Falsch positive Ergebnisse sind ein großer Nachteil vieler PCR-Methoden (Golbang et al., 1999; Martino et al., 2002).

Da das Amplifikat zur Detektion nicht aus dem LightCycler®-Gerät für eine eventuelle weitere Bearbeitung genommen werden muss, sinkt die Gefahr einer Kontamination mit Aspergillen. Diese kommen in der Umgebung vor und können durch die Postamplifikations-Verarbeitung übertragen werden (Loeffler et al., 2000).

Diese Kontaminationen zu minimieren, stellt einen wesentlichen Schritt in der zuverlässigen Diagnostik mittels PCR dar.

Ein weiterer bedeutender Vorteil ist, dass mit dem Real-time-PCR eine standardisierte Methode zur Verfügung steht (Loeffler et al., 2002b; Pryce et al., 2003). Sie ist einfach und schnell durchführbar (Loeffler et al., 2000; Heid et al., 1996).

In dem vorliegenden Projekt zum Beispiel benötigte ein LightCycler-Lauf mit 32 Proben ca. 50 Minuten. Hingegen benötigten wir für die PCR-ELISA-Methode 9 Stunden und mehrere Zwischenschritte.

Das optische System des Lightcycler®-Gerätes kann in zwei verschiedenen Kanälen simultan Fluoreszenzsignale messen. Dadurch können auch verschiedene Pathogene in einer Probe beim selben Lauf erkannt werden (Loeffler et al., 2000).

Die klinische Anwendbarkeit des LightCyclers® in der Aspergillosediagnostik ist noch nicht vollständig geklärt und muss in weiteren Studien untersucht werden.

#### **4.1.5 DNA-Extraktionsmethoden**

Um humanpathogene Pilze im klinischen Material nachweisen zu können, ist es notwendig, die Pilzzellwand aufzuschliessen und die Pilz-DNA freizusetzen, da sonst die geringen DNA-Mengen, die selbst freigesetzt werden, nicht messbar sind.

Die meisten Extraktions-Protokolle sind sehr arbeits- und zeitaufwendig. Bei manchen Methoden gelingt es nicht genügend DNA freizusetzen. Wiederum andere benötigen besondere Zusatzschritte sowie toxische Chemikalien wie Phenol und Chloroform oder Guanidin Thiozyanat (Loeffler et al., 1997; Loeffler et al., 2002b).

In einer Studie von Loeffler et al. wurden fünf verschiedene kommerziell erhältliche Extraktions-Kits und das hauseigene Protokoll miteinander verglichen (Loeffler et al., 1997). Die Sensitivität schwankte hier zwischen 1 bis 1000 Pilzzellen/ml.

Zusätzlich kann bei den vielen verschiedenen Zwischenschritten eine Kontamination mit den ubiquitär vorkommenden Aspergillen stattfinden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Extraktions-Methoden gegenüber gestellt und ihre Anwendbarkeit in der klinischen Routine verglichen. Eine Methode ist die konventionelle manuelle Methode mit dem Quiagen-Kit von der Firma Roche (Loeffler et al., 1998; Loeffler et al., 1999). Der Zeitaufwand dieser Extraktions-Methode beträgt insgesamt sechs Stunden.

Die zweite Methode ist die vollautomatisierte MagNa Pure LC-Extraktion (Loeffler et al., 2002b).

Dieses Gerät hat den Vorteil, dass die DNA-Extraktion völlig automatisch und ohne menschliche Zwischenschritte läuft (Bretagne, 2003). So besteht keine Gefahr, toxischen Chemikalien ausgesetzt zu sein, und das Risiko übertragender Kontaminationen kann gesenkt werden.

In einer Studie von Loeffler et al. wurde dieses Gerät schon etabliert und führte zu äußerst guten Ergebnissen. Die Sensitivität war mit der manuellen Methode vergleichbar (Loeffler et al., 2002b). 67 klinische Proben wurden untersucht.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, eine größere Menge Blutproben zu verwenden und ihre Aussage vor allem im klinischen Alltag zu beobachten.

Mit dem MagNa Pure LC steht eine zuverlässige, standardisierte und vergleichbare Methode der DNA-Extraktion zur Verfügung. Für diese Methode benötigten wir ungefähr zwei Stunden.

#### **4.1.6 Verwendbare Proben**

Grundsätzlich ist die PCR auf jede Probe der Patienten anwendbar. Häufig werden Sputum, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Liquorflüssigkeit oder Blutproben benutzt.

Sputum ist als Probe bedingt geeignet, da damit eine Kolonisation von einer Infektion schwer zu unterscheiden ist (Bretagne, 2003; Skladny et al., 1999).

Da die Lunge der Hauptmanifestationsort invasiver Aspergillosen ist (Van Belkum, 1993), ist die BAL wesentlich besser geeignet, um eine Infektion nachzuweisen (Rantakokko-Jalava et al., 2003; Spiess et al., 2003; Melchers et al., 1994; Tang et al., 1993). Ihre Gewinnung ist jedoch invasiv und bei einigen schwer kranken Patienten kontraindiziert (Yamakami et al., 1996).

In vielen Studien, so auch in der vorliegenden Arbeit, wurden Blutproben der Hochrisikopatienten untersucht. Es war ersichtlich, dass im Blut an Aspergillose erkrankter Patienten Aspergillus-DNA zu finden ist.

Die Anwendung von Blutproben hat den Vorteil, dass sie routinemäßig abgenommen werden können, ohne den Patienten zu gefährden (Yamakami et al., 1996). Somit ist ein PCR-Screening möglich, um auch transiente Fungämien nachweisen zu können.

Eine einzige Blutprobe hat in vielen Fällen keine besondere Aussagekraft. Da Pilz-DNA nicht ständig im Blut zirkuliert, sollten mindestens zwei Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen werden (Chen et al., 2002).

#### **4.1.7 Vergleich der PCR mit anderen etablierten Detektionsverfahren**

Nichtinvasive Methoden zur Diagnostik einer invasiven Aspergillose beinhalten klinische Daten, wie die relativ unspezifische Symptomatik der Infektion, oder bildgebende Verfahren, welche beide nicht zu einer beweisenden Diagnose führen können.

Andererseits kommen andere mikrobiologische Nachweisverfahren wie Blutkultur, Antigen-, Antikörpernachweis und PCR-Verfahren zum Einsatz.

Eine Blutkultur ist sehr zeitaufwendig und hat bei der Aspergillose selten positive Ergebnisse (Einsele et al., 1997; Kami et al., 2001). Die PCR hat im Vergleich zur Blutkultur höhere Sensitivitäten gezeigt (Loeffler et al., 2002a).

Der Nachweis von Antikörpern hat sich nicht bewährt, da sie oft bei immunsupprimierten Patienten fehlen (Golbang et al., 1999; Van Burik et al., 1998b). Ihr Vorhandensein wurde aber mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht.

Eine auch vom EORTC-Konsensus akzeptierte molekularbiologische Methode ist der Antigennachweis (Ascioglu et al., 2002).

Dabei gilt hauptsächlich der Galactomannan-Nachweis mittels ELISA als besonders sensitiv (Maertens et al., 1999), wobei verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind (Pinel et al., 2003; Kawazu et al., 2004).

Auch bei diesem Test wurden falsch positive Ergebnisse berichtet (Bretagne et al., 1998; Pinel et al., 2003).

In einigen Studien ergab die Galactomannan-ELISA-Methode bessere Ergebnisse als eine PCR (Reiss et al., 2000, Bretagne et al., 1998).

## **4.2 Ergebnisse**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in der klinischen Routine einer PBSCT-Station mit Patienten, die nach einer PBSCT oder Chemotherapie gefährdet waren, eine invasive Aspergillose zu entwickeln, das Blut dieser Patienten nach Aspergillen zu screenen und nachzuprüfen, inwieweit dies eine Hilfe zur Diagnosestellung sein könnte.

Beide Methoden, die verglichen wurden, waren bereits schon in Vorstudien etabliert worden (Loeffler et al., 1998; Loeffler et al. 2002b).



Die Arbeit verlief doppelblind, das heißt: weder die Kliniker noch diejenigen, die die Blutproben bearbeiteten, wussten gegenseitig von ihren Ergebnissen.

Leider war das Ergebnis enttäuschend. Weder die Ergebnisse des LightCycler®-Systems noch die der PCR-ELISA korrelierten mit der Klinik.

Von insgesamt 55 Patienten hatten zwei Patienten die Diagnose einer sicheren IA und 3 Patienten die einer wahrscheinlichen IA.

19 Patienten hatten eine mögliche IA. Bei den restlichen 31 Patienten gab es keinen klinischen Anhalt für eine Infektion mit Aspergillen.

#### **4.2.1 Patienten mit sicherer und wahrscheinlicher Diagnose einer IA**

Von den beiden sicheren IA-Patienten gab es 11 Proben. Der LightCycler® zeigte keine positiven Ergebnisse.

Dagegen gab es mit der MagNa Pure-extrahierten DNA und dem PCR-ELISA drei positive Ergebnisse.

Diese niedrige Sensitivität ist vielleicht damit zu erklären, dass bei beiden Patienten der richtige Zeitpunkt der Blutentnahme verfehlt wurde.

In verschiedenen Studien ist berichtet worden, dass eine Aspergillus Fungämie selten ist (Rantakokko-Jalava et al., 2003; Girmenia et al., 2001; Duthie et al., 1995) und kurze Episoden von transienter Fungämie vorkommen (Lass-Floerl et al., 2001).

In einem Tiermodell mit Aspergillus infizierten Tieren war die PCR nur bei 25% der Blutproben positiv (Loeffler et al., 2002a).

Auch könnte eine eventuell sehr kurze Halbwertszeit der zirkulierenden DNA von unter 5 Minuten für die Schwierigkeit, sie zu erfassen, verantwortlich sein (Buchheidt et al., 2004).

Von einer Patientin (die Nummer 29) hatten wir nur 4 Blutproben. Es ist beschrieben worden, dass je höher die Anzahl der Proben, desto eher ist die Wahrscheinlichkeit der Positivität (Buchheidt et al., 2004), da die DNA nicht ständig ins Blut freigesetzt wird.

Bei der zweiten Patientin (Nummer 48) wurden die Blutproben entnommen, als die pulmonalen pilztypischen Infiltrate gerade im Begriff waren, sich zu entwickeln.

Die Aspergillose wurde dann einige Wochen später mittels Abstrich bewiesen. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme die Infektion sich noch nicht vollständig ausgebreitet hatte. Eventuell hätten weitere Blutproben positive Ergebnisse zeigen können.

Von den 3 Patienten mit einer probable IA wurden 4 Proben mit der MagNA Pure-PCR-ELISA-Methode positiv detektiert und 4 Proben mit der Handextraktion und PCR-ELISA.

Zwei Proben wurden mit beiden Methoden PCR-ELISA positiv.

Die restlichen 22 Proben waren negativ.

Alle Patienten bekamen aspergilluswirksame Antimykotika. Inwieweit das die Ergebnisse beeinflusst, ist noch nicht ganz geklärt, aber auch in anderen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen antimykotischer Therapie und PCR-Negativität entdeckt (Ferns et al., 2002; Einsele et al., 1997, Van Burik et al., 1998b; Buchheidt et al., 2004; Lass-Floerl et al., 2001).

#### **4.2.2 Leistungsvergleich LightCycler® versus PCR-ELISA**

Unabhängig von der Extraktionmethode konnte mit dem LightCycler keine positiven Ergebnisse erzielt werden.

Änderungen des MagNa Pure-Kits, des Temperaturprofils im LightCycler®-Instrument und der Mastermixzusammensetzung brachten auch keine positiven Ergebnisse ein.

Diesbezüglich ist es schwer, eine Aussage zu machen, da die Anzahl der Patienten mit bewiesener Aspergillose mit zwei Patienten sehr gering war.

Da die meisten Patienten nur eine mögliche, beziehungsweise keine Aspergillose hatten, war das Ergebnis recht befriedigend, da zumindest keine falsch positiven Ergebnisse vorlagen.

Andere Studien berichten von einer geringeren Sensitivität des LightCyclers® gegenüber der nested PCR (Buchheidt et al., 2004; Spiess et al., 2003).

Der Schwellenwert der DNA-Konzentration scheint, wenn er detektiert wird, bei anderen PCR-Methoden niedriger zu sein als beim LightCycler®.

Es wäre aber möglich, dass mit anderen PCR-Verfahren auch andere Spezies als *Aspergillus fumigatus* detektierbar sind und daraus falsch positive Ergebnisse resultieren (Buchheidt et al., 2004; Sanguinetti et al., 2003).

In den meisten Studien wurde für den LightCycler® mehr Blut verwendet als bei der vorliegenden Arbeit (Spiess et al., 2003). Verwendet wurde 1 ml für die MagNa Pure-Extraktion und 5 ml für die Manuelle DNA-Extraktion.

Eventuell wurden wegen der geringen Blutmenge die positiven Ergebnisse der 3 MagNa Pure-PCR-ELISA-Methode vom LightCycler nicht erkannt.

Mit der PCR-ELISA Methode lieferte sehr viel niedrigere Sensitivitäten als vorherige Studien (Loeffler et al., 1998; Lass-Floerl et al., 2001; Golbang et al., 1999).

Ebenfalls niedrigere Sensitivitäten als erwartet hatten Buchheidt et al. in einer Studie mit nested PCR und LightCycler® (Buchheidt et al., 2004).

Die meisten Studien wie zum Beispiel die Studie von Loeffler et al. haben vorselektierte Patienten untersucht und hatten somit eine höhere Anzahl an Proben und probable IA-Fälle (Loeffler et al. 2000; Spiess et al., 2003; Imhof et al., 2003; Hebart et al., 2000b).

Da dieses Projekt sich auf das ganze Patientenkollektiv mit Hochrisikokonstellation bezieht, sind bei der vorliegenden Studie viel mehr Patienten ohne Anhalt für eine invasive Aspergillose vertreten. Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse eventuell erklären.

Dennoch wurden mit der PCR-ELISA-Methode die Patienten mit proven und probable IA als positiv erkannt.

Allerdings gab es auch bei den Patienten ohne Anhalt für eine IA positive Ergebnisse.

Falsch positive Ergebnisse wurden bisher auch von einigen anderen Studien angegeben (Golbang et al., 1999). Die PCR-Verfahren scheinen eine Anfälligkeit für falsch positive Ergebnisse zu haben (Van Burik et al., 1998, Bretagne, 2003).

Andererseits ist es möglich, dass einige dieser Patienten sehr wohl mit Aspergillen infiziert waren, jedoch keine Symptome zeigten.

#### **4.2.2 Leistungsvergleich MagNa Pure versus manueller DNA-Extraktion**

Paradoxerweise sind bei unserer Studie mehr positive Ergebnisse mit der MagNa Pure-Methode als mit der Handextraktion erreicht worden.

Da alle unsere Negativkontrollen negativ und die Positivkontrollen positiv geblieben sind, ist es schwer nachzuvollziehen, wie dieses Ergebnis zustande kam.

Die Extraktion mittels MagNa Pure LC-Instrument hat sich in einigen Vorstudien gegenüber der manuellen Extraktion als sehr vorteilhaft erwiesen (Loeffler et al., 2002b).

Sie ist weniger zeit- und arbeitsaufwendig und geht mit geringerer Kontaminationsgefahr einher. Dies wurde mit der Studie von Loeffler et al. bewiesen.

Die Patienten mit der proven Aspergillose wurden nur mit der automatischen Extraktion als positiv erkannt.

Die Patienten mit probable IA wurden von beiden Methoden gleichermaßen erkannt.

In der Gruppe der Patienten mit einer möglichen Aspergillose, sowie in der Gruppe der Patienten ohne Anhalt für eine IA, überwog der Anteil von positiven MagNa Pure-Ergebnissen.

Also war auch die falsch positive Rate bei der MagNa Pure-Extraktion höher. Da diese aber nur vom PCR-ELISA erkannt wurden und nicht vom LighCycler®, könnte das auch ein Hinweis darauf sein, dass die PCR-ELISA auch andere fungale Pathogene erkennt und weniger spezifisch ist.

Zu bedenken wäre, dass die Fungämie auch bei nicht an einer Aspergillose Erkrankten vorkommen könnte. In der Studie von Girmenia et al. wird beschrieben, dass eine Aspergillusfungämie nicht immer notwendigerweise mit einer Infektion korreliert (Girmenia et al., 2001).

Andere Studien belegen auch die Rolle der PCR-Positivität als ein Kriterium, um ein erhöhtes Risiko für eine IA zu erkennen und eine prophylaktische Therapie zu beginnen (Hebart et al., 2000a, Lass-Floerl, 2001).

### **4.3 Kontaminationen**

Einer der Kritikpunkte gegenüber dem PCR-Nachweisverfahren in der Klinik ist dessen Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen (Martino et al., 2002). Gerade Aspergillussporen, die ubiquitär vorkommen, können die Quelle solcher Kontaminationen sein.

In dieser Studie wurden alle empfohlenen Maßnahmen unternommen, um solchen Kontaminationen vorzubeugen.

So wurden Schutzmasken und Handschuhe getragen. Die Vorbereitung der Proben für die Extraktion und die Extraktion selbst verliefen in separaten

Räumen und unter verschiedenen Sterilbänken wie auch die Vorbereitung auf die Amplifikation.

Eine Studie von Loeffler et al. stellte fest, dass einige Produkte manchmal mit verschiedenen Pathogenen kontaminiert sind (Loeffler et al., 1999).

Durch den Einsatz von Negativ- und Positivkontrollen wurde versucht, falsch positive beziehungsweise falsch negative Ergebnisse zu kontrollieren.

Dennoch ist nicht auszuschließen, dass durch Luft oder Produktübertragung einige Proben in der PCR-ELISA falsch positive Ergebnisse lieferten.

#### **4.4 Zukunft**

Die Diagnose der invasiven Aspergillose bleibt eine Herausforderung für den Kliniker.

Keiner der nichtinvasiven Diagnose-Methoden kann eine Aspergillose sichern. So muss der Kliniker verschiedene Kriterien zusammenfügen, um eine Diagnose stellen zu können. Die Kombination von klinischen Symptomen, bildgebenden Verfahren, molekularbiologischen Methoden und wenn möglich Biopsie und Abstrich bietet die Möglichkeit zur richtigen Diagnose.

Weitere prospektive Studien, die sich auf ein größeres Patientenkollektiv beziehen, werden zeigen müssen, welchen Stellenwert die Real-time-PCR in der Diagnostik einnehmen kann.

## 5. Zusammenfassung

Die invasive Aspergillose ist eine gefährliche und relativ häufige Komplikation bei immunsupprimierten Patienten. Ihre Diagnose geht mit einigen Schwierigkeiten einher, da keine besonders spezifischen Symptome auftreten und noch keine nicht-invasive Nachweisverfahren für den Nachweis einer Infektion existieren.

Vielversprechend in der Diagnostik zeigten sich bisher unterschiedliche PCR-Verfahren.

In der hier vorliegenden Studie wurden zwei verschiedene DNA-Extraktionsmethoden sowie zwei verschiedene PCR-Detektionsverfahren miteinander verglichen.

Dies beinhaltete die Handextraktion mittels Quiagen-Kit® von der Firma Roche gegen die automatische DNA-Extraktion mit der Maschine MagNa Pure LC und eine PCR-ELISA gegen den LightCycler®.

Das MagNa Pure LC und LightCycler®-Instrument hatten den Vorteil, dass sie nicht so arbeits- und zeitintensiv wie die manuelle DNA-Extraktion und das PCR-ELISA waren. Außerdem sollte durch die weniger notwendigen Zwischenschritte das Risiko einer Kontamination gesenkt werden.

55 Hochrisikopatienten wurden nach einer PBSCT bzw. nach einer Chemotherapie 325 EDTA-Blutproben entnommen. Dies wurde in zwei Hälften geteilt und jeweils eine Hälfte mit einer der beiden Extraktionsmethoden extrahiert. Anschließend wurden die Proben mit den verschiedenen PCR-Verfahren amplifiziert und detektiert.

Von den 55 Patienten hatten 2 Patienten nach den EORTC-Kriterien eine proven und 3 Patienten eine probable Aspergillose. 19 Patienten zeigten die Diagnose einer possible Aspergillose. Bei den restlichen 31 Patienten gab es keinen Anhalt für eine Infektion mit Aspergillen.

Unabhängig von der Extraktionsmethode konnten mit dem LightCycler® keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Auch Konzentrationsänderungen im Mastermix sowie Variationen der MagNa Pure-Extraktion änderten nichts an den Ergebnissen.

Mit der MagNa Pure-Extraktion und dem PCR-ELISA konnten 77 positive Ergebnisse erzielt werden. Dabei wurden die beiden proven und zwei der 3 probable Patienten entdeckt.

Bei 34 Proben von Patienten ohne Anhalt für eine invasive Aspergillose wurden die Ergebnisse positiv. Diese wurden als falsch Positive erfasst.

Die manuelle DNA-Extraktion und die PCR-ELISA ergaben 62 positive Ergebnisse. Alle 3 Patienten mit probable Aspergillose wurden mit dieser Methode positiv. Die Patienten mit der sicheren Diagnose einer IA wiesen dagegen keine positiven Ergebnisse auf.

Übereinstimmungen der positiven Ergebnisse gab es bei 9 Proben, 2 davon waren von Patienten mit einer probable Aspergillose.

Falsch positive Ergebnisse gab es bei 30 Proben von Patienten ohne klinische Zeichen einer Infektion.

Die geringe Sensitivität des LightCyclers® in der vorliegenden Arbeit und die hohe Anzahl an falsch positiven Ergebnissen mittels PCR-ELISA machen es unmöglich, diese Verfahren als alleinige Nachweisverfahren in der Diagnostik invasiver Aspergillosen zu verwenden. Nach wie vor ist es notwendig, eine Kombination verschiedener Befunde zur Diagnosefindung in Betracht zu ziehen.



## Literaturverzeichnis

- 1) Aisner, J., Wiernik, P.H., Schimpff, S.C. (1977)**  
Treatment of invasive aspergillosis: relation of early diagnosis and treatment to response.  
Ann. Intern. Med. 86, 539-43
- 2) Alexander, B.D. (2002)**  
Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory.  
Transpl. Infect. Dis. 3, 32-7
- 3) Ascioğlu, S., Rex, J.H., De Pauw, B., Bennett, J.E., Bille, J., Crokaert, F., Denning, D.W., Donnelly, J.P., Edwards, J.E., Erjavec, Z., Fiere, D., Lortholary, O., Maertens, J., Meis, J.F., Patterson, T.F., Ritter, J., Selleslag, D., Shah, P.M., Stevens, D.A., Walsh, T.J. (2002)**  
Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplant: an international consensus.  
Clin. Infect. Dis. 34, 7-14
- 4) Baddley, J.W., Stroud, T.P., Salzman, D., Pappas, P.G. (2001)**  
Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients.  
Clin. Infect. Dis. 32, 1319-24
- 5) Baden, L.R., Katz, J.T., Fishman, J.A., Koziol, C., DeVecchio, A., Doran, M., Rubin, R.H. (2003)**  
Salvage therapy with voriconazole for invasive fungal infections in patients failing or intolerant to standard antifungal therapy.  
Transplantation 76, 1632-7
- 6) Van Belkum, A., Quint, W.G.V., De Pauw, B.E., Melchers, W.J.G., Meis, J.F. (1993)**  
Typing of Aspergillus species and Aspergillus fumigatus isolates by interrepeat Polymerase Chain Reaction.  
J. Clin. Microbiol. 31, 2502-2505
- 7) Bennett, J.E., Powers, J., Walsh, T., Viscoli, C., De Pauw, B., Dismukes, W., Galgiani, J., Glauser, M., Herbrecht, R., Kauffman, C., Lee, J., Pappas, P., Rex, J., Verweij, P. (2003)**  
Forum Report: Issues in clinical trials of empirical antifungal therapy in treating febrile neutropenic patients.  
Clin. Infect. Dis. 36, 117-22
- 8) Braedel, S., Radsak, M., Einsele, H., Latge, J.P., Michan, A., Loeffler, J., Haddad, Z., Grigoleit, U., Schild, H., Hebart, H. (2004)**  
Aspergillus fumigatus antigens activate innate immune cell via toll-like receptors 2 and 4.

Br. J. Haematol. 125, 329-9

**9) Bretagne, S. (2003)**

Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays.

Clin. Microbiol. Infect. 9, 505-511

**10) Bretagne, S., Costa, J.M., Bart-Delabesse, E., Dhedin, N., Rieux, C., Cordonnier, C. (1998)**

Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis.

Clin. Infect. Dis. 26, 1407-12

**11) Buchheidt, D., Hummel, M., Schleiermacher, D., Spiess, B., Schwertfeger, R., Cornely, O.A., Wilhelm, S., Reuter, S., Kern, W., Südhof, T., Mörz, H., Hehlmann, R. (2004)**

Prospective clinical evaluation of a LightCycler<sup>TM</sup>-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients.

Brit. J. of Haem. 125, 196-202

**12) Van Burik, J.A., Colven, R., Spach, D.H. (1998a)**

Cutaneous Aspergillosis.

J. Clin. Microbiol. 36, 3115-3121

**13) Van Burik, J.A., Myerson, D., Schreckhise, R.W., Bowden, R.A. (1998b)**

Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens.

J. Clin. Microbiol. 36, 1169-1175

**14) Caillot, D., Casanovas, O., Bernard, A., Couaillier, J.F., Durand, C., Cuisenier, B., Solary, E., Piard, F., Petrella, T., Bonnin, A., Couillault, G., Dumas, M., Guy, H. (1997)**

Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery.

J. Clin. Oncol. 15, 139-47

**15) Chen, S.C., Halliday, C.L., Meyer, W. (2002)**

A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays.

Med. Mycol. 40, 333-57

**16) Costa, C., Vidaud, D., Olivi, M., Bart-Delabesse, E., Vidaud, M., Bretagne, S. (2001)**

Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum.

J. Microbiol. Methods. 44, 263-9

**17)Costa, C., Costa, J.M., Desterke, C., Botterel, F., Cordonnier, C., Bretagne, S. (2002)**

Real-time PCR Coupled with automated DNA extraction and detection of Galaktomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis.

J. Clin. Microbiol. 40, 2224-2227

**18)Denning, D.W. (1998)**

Invasive aspergillosis.

Clin. Infect. Dis. 26, 781-805

**19)Dismukes, W.E. (2000)**

Introduction to antifungal drugs.

Clin. Infect. Dis. 30, 653-7

**20)Duthie, R., Denning, D.W. (1995)**

Aspergillus fungemia: report of two cases and review.

Clin. Infect. Dis. 20, 598-605

**21)Von Eiff, M., Roos, N., Schulten, R., Hesse, M., Zuhlsdorf, M., Van de Loo, J. (1995)**

Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival.

Respiration. 62, 341-7

**22)Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Loeffler, J., Rotenhofer, I., Mueller, C.A., Bowden, R.A., Van Burik, J.A., Engelhard, D., Kanz, L., Schumacher, U. (1997)**

Detection and Identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes.

J. Clin. Microbiol. 35, 1353-1360

**23)Einsele, H., Heesemann, J., Roggenkamp, A., Hengel, H., Koszinowski, U. (2000)**

Infektionen bei Immunsuppression.

In: Marre, R., Mertens, T., Trautmann, M., Vanek, E.: Klinische Infektiologie. 811-35

Urban&Fischer Verlag, München, Jena.

**24)Einsele, H., Bertz, H., Beyer, J., Kiehl, M.G., Runde, V., Kolb, H.J., Holler, E., Beck, R., Schwerdfeger, R., Schumacher, U., Hebart, H., Martin, H., Kienast, J., Ullmann, A.J., Maschmeyer, G., Krueger, W., Link, H., Schmidt, C.A., Oelette, H., Klingebiel, T. (2001)**

Epidemiologie und interventionelle Therapiestrategien infektiöser Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation.

Dtsch. Med. Wochenschr. 126, 1278-1284

**25)Einsele, H., Bertz, H., Beyer, J., Kiehl, M.G., Runde, V., Kolb, H.J., Holler, E., Beck, R., Schwerdfeger, R., Schumacher, U., Hebart, H., Martin, H., Kienast, J., Ullmann, A.J., Maschmeyer, G., Krueger, W., Niederwieser, D., Link, H., Schmidt, C.A., Oelette, H., Klingebiel, T. (2003)**

Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies—guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Onkology (DGHO).

Ann. Hematol. 82, 175-85

**26)Ferns, R.B., Flechter, H., Bradley, S., Mackinnon, S., Hunt, C., Tedder, R.S. (2002)**

The prospective evaluation of a nested polymerase chain reaction assay for early detection of Aspergillus infection in patients with leukaemia or undergoing allograft treatment.

Br. J. Haematol. 119, 720-725

**27)Fukuda, T., Boeckh, M., Carter, R.A., Sandmaier, B.M., Maris, M.B., Maloney, D.G., Martin, P.J., Storb, R.F., Marr, K.A. (2003)**

Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning.

Blood 102, 827-833

**28)Geffer, W.B., Albelda, S.M., Talbot, G.H., Gerson, S.L., Cassileth, P.A., Miller, W.T. (1985)**

Invasive pulmonary aspergillosis and acute leukemia. Limitations in diagnostic utility of the air crescent sign.

Radiology 157, 605-10

**29)Gerson, S.L., Talbot, G.H., Lusk, E., Hurwitz, S., Strom, B.L., Cassileth, P.A. (1985)**

Invasive pulmonary aspergillosis in adult acute leukaemia: clinical clues to its diagnosis.

Clin. Oncol. 3, 1109-16

**30)Girmenia, C., Nucci, M., Martino, P. (2001)**

Clinical significance of Aspergillus fungaemia in patients with haematological malignancies and invasive aspergillosis.

Br. J. Haematol. 114, 93-8

**31)Golbang, N., Burnie, J.P., Matthews, R.C. (1999)**

A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by Aspergillus fumigatus.

J. Clin. Pathol. 52, 419-423

**32)Gow, K.W., Hayes-Jordan, A.A., Billups, C.A., Shenep, J.L., Hoffer, F.A., Davidoff, A.M., Rao, B.N., Schropp, K.P., Shochat, S.J. (2003)**

Benefit of surgical resection of invasive pulmonary aspergillosis in pediatric patients undergoing treatment for malignancies and immunodeficiency syndromes.

J. Pediatr. Surg. 38, 1354-60

**33)Gulbahce, H.E., Pambuccian, S.E., Jessurun, J., Woodard, P., Steiner, M.E., Manivel, J.C., Hite, S., Ramsay, N.K., Baker, K.S. (2004)**

Pulmonary nodular lesions in bone marrow transplant recipients: impact of histologic diagnosis on patient management and prognosis.

Am. J. Clin. Pathol., 121, 205-10

**34)Hawkins, C., Armstrong, D. (1984)**

Fungal infections in the immunocompromised host.

Cli. Haematol. 13, 599-630

**35)Hebart, H., Loeffler, J., Meisner, C., Serey, F., Schmidt, D., Boehme, A., Martin, H., Engel, A., Bunjes, D., Kern, W.V., Schumacher, U., Kanz, L., Einsele, H. (2000a)**

Early detection of Aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening.

J. Infect. Dis. 181, 1713-9

**36)Hebart, H., Loeffler, Reitze, H., H., Engel, A., Schumacher, U., Klingebiel, T., Bader, P., Boehme, A., Martin, H., Bunjes, D., Kern, W.V., Kanz, L., Einsele, H. (2000b)**

Prospective screening by a panfungal polymerase chain reaction assay in patients at risk for fungal infections: implications for the management of febrile neutropenia.

Brit. J. Haemat. 111, 635-640

**37)Hebart, H., Bollinger, C., Fisch, P., Sarfati, J., Meisner, C., Baur, M., Loeffler, J., Monod, M., Latge, J.P., Einsele, H. (2002)**

Analysis of T-cell responses to Aspergillus fumigatus antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies.

Blood. 100, 4521-8

**39)Hebart, H., Einsele, H. (2004)**

Specific infectious complications after stem cell transplantation.

Support. Care Cancer. 12, 80-5

**40)Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996)**

Real time quantitative PCR.

Genome. Res. 6, 986-94

**41)Imhof, A., Schaer, C., Schoeden, G., Schaer, D.J., Walter, R.B., Schaffner, A., Schneemann, M. (2003)**

Rapid detection of pathogenic fungi from clinical specimens using LightCycler real-time fluorescence PCR.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 22, 558-60

**42)Jantunen, E., Anttila, V.J., Ruutu, T. (2002)**

Aspergillus infections in allogeneic stem cell transplant recipients: have we made any progress?

Bone Marrow Transplant. 30, 925-9

**43)Kami, M., Fukui, T., Ogawa, S., Kazuyama, Y., Machida, U., Tanaka, Y., Kanda, Y., Kashima, T., Yamazaki, Y., Hamaki, T., Mori, S., Akiyama, H., Mutou, Y., Sakamaki, H., Osumi, K., Kimura, S., Hiraj, H. (2001)**

Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive Aspergillosis.

Clin. Infect. Dis. 33, 1504-12

**44)Kawamura, S., Maesaki, S., Noda, T., Hirakata, Y., Tomono, K., Tashiro, T., Kohno, S. (1999)**

Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis.

J. Clin. Microbiol. 37, 218-20

**45)Kawazu, M., Kanda, Y., Nannya, Y., Aoki, K., Kurokawa, M., Chiba, S., Motokura, T., Hirai, H., Ogawa, S. (2004)**

Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for Galactmannan, and a (1->3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with haematological disorders.

J. Clin. Microbiol. 42, 2733-41

**46)Keating, G.M., Jarvis, B. (2001)**

Caspofungin

Drugs. 61, 1121-9

**47)Larkin, J.A., Greene, J.N., Sandin, R.L., Houston, S.H. (1996)**

Primary cutaneous aspergillosis: case report and review of the literature.

Infect. Contril. Hosp. Epidemiol. 17, 563-6

**48)Lass-Floerl, C., Aigner, J., Gunsilius, E., Petzer, A., Nachbauer, D., Gastl, G., Einsele, H., Loeffler, J., Dietrich, M.P., Wuerzner, R. (2001)**

Screening for Aspergillus spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies.

Brit. J. Haemat. 113, 180-184

**49)Latge, J.P. (1999)**

Aspergillus fumigatus and Aspergillosis.

Clin. Microbiol. Rev. 12, 310-350

**50)Lin, S.J., Schranz, J., Teutsch, S.M. (2001)**

Aspergillosis case-fatality rate: systemic review of the literature.  
Clin. Infect. Dis. 32, 358-66

**51)Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., Reitze, H., Einsele, H. (1997)**

Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from culture and blood.  
J. Clin. Microbiol. 35, 3311-3312

**52)Loeffler, J., Hebart, H., Sepe, S., Schumacher, U., Klingebiel, T., Einsele, H. (1998)**

Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system.  
Med. Mycol. 36, 275-9

**53)Loeffler, J., Hebart, H., Bialek, R., Hagemeyer, L., Schmidt, D., Serey, F.P., Hartmann, M., Eucker, J., Einsele, H. (1999)**

Contamination occurring in fungal PCR assays.  
J. Clin. Microbiol. 37, 1200-1202

**54)Loeffler, J., Henke, N., Hebart, H., Schmidt, D., Hagemeyer, L., Schumacher, U., Einsele, H. (2000)**

Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler system.  
J. Clin. Microbiol. 38, 586-590

**55)Loeffler, J., Hebart, H., Cox, P., Flues, N., Schumacher, U., Einsele, H. (2001)**

Nucleic acid sequence-based amplification of Aspergillus RNA in blood samples.  
J. Clin. Microbiol. 39, 1626-1629

**56)Loeffler, J., Kloepfer, K., Hebart, H., Najvar, L., Graybill, J.R., Kirkpatrick, W.R., Patterson, T.F., Dietz, K., Bialek, R., Einsele, H. (2002a)**

Polymerase chain reaction detection of Aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis.  
J. Infect. Dis. 185, 1203-6

**57)Loeffler, J., Schmidt, K., Hebart, H., Schumacher, U., Einsele, H. (2002b)**

Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system.  
J. Clin. Microbiol. 40, 2240-2243

**58)Maertens, J., Verhaegen, J., Demuynck, H., Brock, P., Verhoef, G., Vandenberghe, P., Van Eldere, J., Verbist, L., Boogaerst, M. (1999)**

Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis.  
J. Clin. Microbiol. 37, 3223-8

**59)Marr, K.A., Carter, R.A., Boeckh, M., Martin, P., Corey, L. (2002a)**  
Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors.  
Blood 100, 4358-4366

**60)Marr, K.A., Carter, R.A., Crippa, F., Wald, A., Corey, L. (2002b)**  
Epidemiology and outcome of mould infections in haematopoietic stem cell transplant recipients.  
Clin. Infect. Dis. 34, 909-17

**61)Martino, R., Subira, M. (2002)**  
Invasive fungal infections in haematology: new trends.  
Ann. Hemato. 81, 233-243

**62)Maschmeyer, G., Beinert, T., Buchheidt, D., Einsele, H., Heussel, C.P., Kiehl, M., Lorenz, J. (2003)**  
Diagnosis and antimicrobial therapy of pulmonary infiltrates in febrile neutropenic patients--guidelines of the infectious diseases working party (AGIHO) of the German society of Hematology and Onkology (DGHO).  
Ann. Hematol. 82, 118-26

**63)Melchers, W.J., Verweij, P.E., van den Hurk, P., van Belkum, A., De Pauw, B.E., Hoogkamp-Korstanje, J.A., Meis, J.F. (1994)**  
General primer-mediated PCR for detection of Aspergillus species.  
J. Clin. Microbiol. 32, 1710-7

**64)Mennink-Kersten, M.A., Donnelly, J.P., Verweij, P.E. (2004)**  
Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis.  
Lancet. Infect. Dis. 4, 349-57

**65)Muller, F.M., Trusen, A., Weig, M. (2002)**  
Clinical manifestations and diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised children.  
Eur. J. Pediatr. 161, 563-74

**66)Oliveira, J.S., Kerbauy, F.R., Colombo, A.L., Bahia, D.M., Pinheiro, G.S., Silva, M.R., Ribeiro, M.S., Raineri, G., Kerbauy, J. (2002)**  
Fungal infections in marrow transplant recipients under antifungal prophylaxis with fluconazole.  
Braz. J. Med. Biol. Res. 35, 789-98



**67)Patterson , T.F., Kirkpatrick, W.R., White, M., Hiemenz, J.W., Wingard, J.R., Dupont, B., Rinaldi, M.G., Stevens, D.A., Graybill, J.R. (2000)**

Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus study group.  
Medicine (Baltimore). 79, 250-60

**68)Pfaffenbach, B., Donhuijsen, K., Pahnke, J., Bug, R., Adamek, R.J., Wegener, M., Ricken, D. (1994)**

Systemic fungal infections in hematologic neoplasms. An autopsy study of 1,053 patients.  
Med. Klin. (Munich) 89, 299-304

**69)Pinel C., Fricker-Hidalgo, H., Lebeau, B., Garban, F., Hamidfar, R., Ambroise-Thomas, P., Grillot, R. (2003)**

Detection of circulating Aspergillus fumigatus Galactomannan: Value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis.  
J. Clin. Microbiol. 41, 2184-2186

**70)Pryce, T.M., Kay, I.D., Palladino, S., Heath, C.H. (2003)**

Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect Candida albicans and Aspergillus fumigatus DNA in whole blood from high-risk patients.  
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47, 487-96

**71)Raad, I., Hanna, H., Sumoza, D., Albitar, M. (2002)**

Polymerase chain reaction on blood for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients.  
Cancer. 94, 1032-6

**72)Rantakokko-Jalava, K., Laaksonen, S., Issaksonainen, J., Vauras, J., Nikoskel-ainen, J., Viljanen, M.K., Salonen, J. (2003)**

Semiquantitative Detection by Real-time-PCR of Aspergillus fumigatus in broncho-alveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis.  
J. Clin. Microbiol. 41, 4304-4311

**73)Reiss, E., Tanaka, K., Bruker, G., Chazalet, V., Coleman, D., Debenaupuis, J.P., Hanazawa, R., Latge, J.P., Lorthilary, J., Makimura, K., Morrison, C.J., Murayama, S.Y., Naoe, S., Paris, S., Sarfati, J., Shibuya, K., Sullivan, D., Uchida, K., Yamaguchi, H. (1998)**

Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections.  
Med. Mycol. 36, 249-57

**74)Reiss, E., Obayashi, T., Orle, K., Yoshida, M., Zancope-Oliveira, R.M. (2000)**

Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections.  
Med. Mycol. 38, 147-59

- 75)Rowen J.L., Atkins, J.T., Levy, M.L., Baer, S.C., Baker, C.J. (1995)**  
 Invasive fungal dermatitis in the <or=1000-gram neonate.  
 Pediatrics. 95, 682-7
- 76)Ruhnke, M. (2000)**  
 Antimykotische Therapie.  
 In: Marre, R., Mertens, T., Trautmann, M., Vanek, E.: Klinische Infektiologie.  
 134-47  
 Urban&Fischer Verlag, München, Jena.
- 77)Ruhnke, M., Beyer, J., Borg-von Zepelin, M., Heußel, C.P., Hummel, M., Kauczor, H.U., Lippek, F., Mueller, F.M., Schmidt-Westhausen, A., Tietz, H.J. (2003)**  
 Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten.  
 UNI-MED Verlag AG, Bremen, London, Boston.
- 78)Sanguinetti, M., Posteraro, B., Pagano, L., Pagliari, G., Fianchi, L., Mele, L., La Sorda, M., Franco, A., Fadda, G. (2003)**  
 Comparison of real-time-PCR, conventional PCR, and Galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis.  
 J. Clin. Microbiol. 41, 3922-3925
- 79)Schlegel, P.G. (2001)**  
 Stammzelltherapie.  
 In: Speer, C.P., Gahr, M.: Pädiatrie, 730-739  
 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- 80)Singh, N. (2001)**  
 Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices.  
 Clin. Infect. Dis. 33, 1692-6
- 81)Skladny, H., Buchheidt, D., Baust, C., Krieg-Schneider, F., Seifarth, W., Leib-Moesch, C., Hehlmann, R. (1999)**  
 Specific detection of Aspergillus species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR.  
 J. Clin. Microbiol. 37, 3865-3871
- 82)Soubani, A.O., Qureshi, M.A. (2002)**  
 Invasive pulmonary aspergillosis following bone marrow transplantation: risk factors and diagnostic aspect.  
 Haematologia (Budap). 32, 427-37
- 83)Spiess, B.,Buchheidt, D., Baust, C., Skladny, H., Seifarth, W., Zeilfelder, U., Leib-Moesch, C., Moerz, H., Hehlmann, R. (2003)**

Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients.

J. Clin. Microbiol. 41, 1811-1818

**84)Staib, P., Morschhäuser, J., Hacker, J. (2000)**

Pilze.

In: Marre, R., Mertens, T., Trautmann, M., Vanek, E.: Klinische Infektiologie. 28-33

Urban&Fischer Verlag, München, Jena.

**85)Steinbach, W.J., Stevens, D.A., Denning, D.W. (2003)**

Combination and sequential antifungal therapy for invasive aspergillosis: review of published in vitro and in vivo interactions and 6281 clinical cases from 1966-2001.

Clin. Infect. Dis. 37, 188-224

**86)Stevens, D.A. (2002)**

Diagnosis of fungal infections: current status.

J. Antimicrobial chemotherapy 49, 11-19

**87)Stevens, D.A., Kan, V.L., Judson, M.A., Morrison, V.A., Dummer, S., Denning, D.W., Bennett, J.E., Walsh, T.J., Patterson, T.F., Pankey, G.A. (2000)**

Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America.

Clin. Infect. Dis. 30, 696-709

**88)Subira, M., Martino, R., Franquet, T., Puzo, C., Altes, A., Sureda, A., Brunet, S., Sierra, J. (2002)**

Invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies: survival and prognostic factors.

Haematologica 87, 528-34

**89)Tabbara, I.A., Zimmermann, K., Morgan, C., Nahleh, Z. (2002)**

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results.

Arch. Intern. Med. 162, 1558-66

**90)Tang, C.M., Holden, D.W., Aufauvre-Brown, A., Cohen, J. (1993)**

The detection of *Aspergillus* spp. By the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid.

Am. Rev. Respir. Dis. 148, 1313-7

**91)Thursky, K., Byrnes, G., Grigg, A., Szer, J., Slavin, M. (2004)**

Risk factors for post-engraftment invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplantation.

Bone marrow transplant.

**92)Trevino-Castellano, M., Rodriguez-Novoa, S., Llovo-Taboada, J., Garcia-Zabarte, A., Garcia-Riestra, C., Regueiro-Garcia, B.J. (2003)**

Combined used of RAPD and touchdown PCR for epidemiological studies of *Aspergillus fumigatus*.

Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21, 472-6

**93)Wald, A., Leisenring, W., Van Burik, J.A., Bowden, R.A. (1997)**

Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients under going bone marrow transplantation.

J. Infect. Dis. 175, 1459-66

**94)Wheat, L.J. (2003)**

Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection.

Transpl. Infect. Dis. 5, 158-66

**95)Wiederhold, N.P., Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P. (2003)**

Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies.

Pharmacotherapy 23, 1592-610

**96)Williamson, E.C., Leeming, J.P. (1999)**

Molecular approaches for the diagnosis and epidemiological investigation of *Aspergillus* infection.

Mycoses. 2, 7-10

**97)Williamson, E.C., Leeming, J.P., Palmer, H.M., Steward, C.G., Warnock, D., Marks, D.I., Millar, M.R. (2000)**

Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction.

Br. J. Haematol. 108, 132-9

**98)Yamakami, Y., Hashimoto, A., Tokimatsu, I., Nasu, M. (1996)**

PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis.

J. Clin. Microbiol. 34, 2464-2468

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas meiner Arbeit, sowie seiner Betreuung bei deren Durchführung und Fertigstellung danken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Löffler für die engagierte Betreuung im Labor und seiner großen Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen.

Einen herzlichen Dank an Frau Ingrid Kumbier und Frau Marija Markulin, die mir bei der Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonderen Dank möchte ich an meine Freundin Sandra-Elena Fischer für ihre seelische und moralische Hilfe bei dieser Arbeit richten.

Ebenfalls herzlichen Dank an unsere liebe Freundin Erika Korn für die Korrekturlesung.

Mein herzlicher Dank gilt auch Erika und Dieter Stolz für ihre liebevolle Unterstützung im gesamten Studium.

Bei meinen Eltern und meinem Freund Michael Herm bedanke ich mich für ihre Geduld, Unterstützung und Motivierung bei meinem Studium, das ohne sie nicht möglich gewesen wäre.

## **Lebenslauf**

Mariam Khatiri, geboren am 22.05.1978 in Teheran/Iran.

Familienstand: verheiratet

Namen der Eltern:	Mutter:	Fatemi Seyedeh Solaleh
	Vater:	Khatiri Ghodratollah

### **Schulbildung:**

Grundschule	1984-1987 Grundschule in Teheran/Iran 1988-1990 Sonnenhaldeschule Konstanz/Deutschland
Gymnasium	1990-1999 Alexander von Humboldt Gymnasium/Konstanz Abschlussnote: 1.7

### **Universität:**

Oktober 1999 - Mai 2006 Medizinstudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen

### **Ärztliche Prüfungen:**

08/01	Ärztliche Vorprüfung
08/02	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/03-12/03	Durchführung der Experimente dieser Arbeit
03/05	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19.05.2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Abgeleistete Praktika:**

März	2000	Pflegedienst in München (Bogenhausen)
August	2000	Pflegedienst in München (Neuperlach)
März	2002	Famulatur in Donauspital Wien/Österreich Fachgebiet Pädiatrie
September	2002	Famulatur in Chicago/USA/ Fachgebiet Pädiatrie
September	2003	Famulatur in Engen/Deutschland Fachgebiet Innere Medizin
März	2004	Famulatur in Tübingen/ Fachgebiet Pädiatrie
April 2005 - Mai	2006	praktisches Jahr 1. Tertial: Gynäkologie in London und Ruit 2. Tertial: Chirurgie in Luzern 3. Tertiel: Innere Medizin in Ruit