

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

**Vergleich von konventionellen PCR-Methoden mit den
Aspergillus fumigatus spezifischen Primern TS2 und
AfLC2 und dem Panfungal-Primer für die Aspergillus
fumigatus Diagnostik bei Risikopatienten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sandra Elena Fischer
aus Böblingen
2007

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1.Berichterstatter:	Professor Dr. H. Einsele
2.Berichterstatter:	Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Para mi familia

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung in die invasive Aspergillose	1
1.2	Erreger	1
1.2.1	Einteilung anhand von Diagnosekriterien	2
1.2.2	Krankheitsbilder bei IA	5
1.2.3	Krankheitsbilder bei immunkompetenten Patienten	6
1.3	Epidemiologie.....	6
1.3.1	Inzidenz.....	6
1.3.2	Mortalität	7
1.3.3	Pathogenese	8
1.3.4	Klinik.....	8
1.3.5	Risikogruppen	9
1.3.6	Risikofaktoren	10
1.4	Diagnostik	11
1.4.1	Allgemein	11
1.4.2	Radiologische Befunde	11
1.4.3	Histologie	12
1.4.4	Kultur.....	13
1.4.5	Antigennachweis	13
1.4.6	Antikörpernachweis	14
1.4.7	Nachweis von Aspergillus-DNA mittels PCR.....	14
1.5	Therapie	15
1.5.1	Amphotericin B.....	16
1.5.2	Itraconazol und Voriconazol	17
1.5.3	Caspofungin	17
1.5.4	Immunmodulatoren	18
1.5.5	Chirurgische Resektion	18
1.6	Prophylaxe	18
1.7	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material, Methoden und Patienten	21
2.1	Material und Bezugsquellen	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Verbrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	DNA-Extraktion	23
2.2.2	Konventionelle PCR	24
2.3	Patienten.....	31
3	Ergebnisse	35
3.1	Darstellung der Ergebnisse	35
3.1.1	Darstellung der positiven Ergebnisse	35
3.2	Ergebnisse der PCR-ELISA	36
3.2.1	Ergebnisermittlung mittels PCR-ELISA	36
3.2.2	Gesamtergebnis der PCR-ELISA.....	36
3.2.3	Ergebnis der PCR-ELISA in Bezug auf die Patienten	36
3.3	PCR-Gel mit dem TS2-Primer.....	39

3.3.1	Ergebnisermittlung mittels PCR und Gel mit dem TS2-Primer	39
3.3.2	Gesamtergebnis	39
3.3.3	Sensitivitätsmessung mittels Verdünnungsreihe	39
3.3.4	Aspergilluspezifität.....	40
3.3.5	Positive Ergebnisse des PCR-Gels mit dem TS2-Primer in Bezug auf die Patienten	41
3.4	PCR-Gel mit dem AfLC2-Primer	42
3.4.1	Ergebnisermittlung mittels PCR und Gel mit dem AfLC2-Primer.	42
3.4.2	Gesamtergebnis.....	43
3.4.3	Sensitivitätsmessung für den AfLC2-Primer.....	43
3.4.4	Variation der Magnesiumkonzentration	44
3.4.5	Variation der Zyklenanzahl.....	45
3.4.6	Aspergilluspezifität.....	45
3.5	Vergleich der drei PCR-Verfahren.....	45
3.5.1	Übereinstimmung der positiven Ergebnisse der Panfungal-PCR mit denen der TS2-Primer-PCR	45
3.5.2	Übereinstimmung der Negativproben.....	46
3.5.3	Gesamtübereinstimmung	46
3.5.4	Gesamtergebnis des Vergleichs	46
4	Diskussion.....	48
4.1	Stand der Forschung.....	48
4.1.1	Diagnoseschwierigkeiten.....	50
4.1.2	Aspergillusdetektion mittels PCR	50
4.1.3	Vergleich der konventionellen PCR.....	52
4.1.4	Vergleich der AfLC2-, TS2- und Panfungal-Primer	52
4.1.5	Vergleich zu anderen Detektionsmethoden.....	53
4.1.6	Vergleich von Probenmaterial	54
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	55
4.2.1	Leistung der PCR-ELISA mit dem Panfungal-Primer	56
4.2.2	Leistung des PCR-Gel-Verfahren mit dem TS2-Primer.....	57
4.2.3	Leistung des PCR-Gel-Verfahren mit dem AfLC2-Primer	57
4.3	Schlussfolgerung.....	58
5	Zusammenfassung.....	60
	Abkürzungsverzeichnis.....	62
	Literaturverzeichnis.....	64
	Danksagung	78
	Lebenslauf	79

1 Einleitung

1.1 Einführung in die invasive Aspergillose

Insgesamt betrachtet handelt es sich bei der invasiven Aspergillose um eine seltene Erkrankung. Weltweit stellt sie allerdings in den Kliniken ein immer häufigeres Krankheitsbild dar. Die Ursache hierfür liegt in der steigenden Zahl von Organ- sowie Stammzelltransplantationen, dem zunehmenden Gebrauch von Chemotherapeutika und der daraus folgenden stetig wachsenden Zahl von immunsupprimierten Patienten. (Denning,1998; Hebart et al.,2000; Einsele et al.,2000; White et al.,2006)

Als Todesursache, vor allem bei hämatologischen Patienten, spielt die IA trotz neuer Transplantationsmodalitäten, verbesserter Diagnose- und Therapiemöglichkeiten und intensiver Studien weiterhin eine wesentliche Rolle. Die Mortalitätsrate beträgt bis zu 100 Prozent bei Krebspatienten. (Latge,1999; Wild et al.,2001)

In mehr als 90 Prozent der invasiven Pilzinfektionen werden Aspergillus- und Candidaspezies nachgewiesen.

Der rechtzeitige sicher und spezifischer Nachweis einer IA stellt aufgrund der schwierigen Diagnostik und der nicht eindeutigen Klinik ein großes Problem dar.

(Fukuda et al.,2003; Denning et al.,2003; Marr et al.,2002; Munoz et al.,2006)

1.2 Erreger

Aspergillen gehören zu den sporenbildenden Schimmelpilzen. Sie kommen ubiquitär vor und sind äußerst resistent gegenüber Umwelteinflüssen und Temperaturen. Sie wachsen schnell, vor allem im Erdboden an verrottenden Pflanzen und Abfällen. So können eine hohe Zahl von Aspergillussporen z.B. an Baustellen aufgefunden werden.

Die Sporen werden meist durch die Lunge inhaliert, wo sie beim Gesunden eliminiert werden. Bei immunsupprimierten Patienten können die Sporen jedoch durch verschiedene Virulenzfaktoren wie Katalasen, Proteasen oder Aflatoxine und Gliotoxine die Immunantwort hemmen und zur Erkrankung führen. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht geklärt.

Wichtigster Vertreter in der Klinik ist dabei *Aspergillus fumigatus*, aber auch die Spezies *A.flavus*, *A.terreus*, *A.niger* und *A.nidulans* können als Infektionserreger nachgewiesen werden.

(Staib et al.,2000; Latge,1999; Bretagne,2003; Bhatti et al.,2006)

1.2.1 Einteilung anhand von Diagnosekriterien

Durch die rasant steigende Anzahl von immunsupprimierten Patienten mit Anzeichen einer invasiven Mykose und die damit verbundene hohe Letalität ist es nötig geworden einen Konsensus zu schaffen, der patientenbezogene Risikofaktoren mit der Diagnosewahrscheinlichkeit für eine IA definiert.

Die Diagnostik bei invasiven Mykosen ist sehr schwierig und uneindeutig. Die klinischen Symptome sind oftmals unspezifisch und es gibt weder klare Diagnosekriterien noch sichere Behandlungsstrategien. Die kulturelle Anzucht von *Aspergillus* lässt nicht unterscheiden, ob es sich um eine invasive Erkrankung handelt und verbleiben zudem oftmals negativ. Außerdem können sich eine Reihe von Patienten, aufgrund ihres kritischen Zustandes, keiner invasiven Diagnostik unterziehen, daher werden bei Verdacht viele Patienten empirisch behandelt. (Marr,2002; Stevens,2002; Chamilos et al.,2006)

Daher wurde von den Mitgliedern der Invasive Fungal Infections Cooperative Group (IFICG) der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) in Zusammenarbeit mit den Mitgliedern der Mycoses Study Group (MSG) des National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) für wissenschaftliche Zwecke diese Klassifikation erarbeitet.

Sie teilt Patientenkollektive in die Diagnosen gesicherte invasive Aspergillose (proven), wahrscheinliche invasive Aspergillose (probable) und mögliche invasive Aspergillose (possible) auf.

Folgende Tabelle gibt eine Übersicht der EORTC/IFICG und MSG/NIAID-Einteilung. (Ascioglu et al.,2002; Wild et al.,2001)

Tabelle 1: Patienten Kriterien und invasive Aspergillose

Diagnose	Patientenkriterien
gesicherte IA	<p>Aspergillus typische Hyphen in histologischem bzw. zytologischem Material nachgewiesen</p> <p>oder</p> <p>positive Kultur für Aspergillus aus einer sterilen Probe, die von einem Areal stammt, das sich klinisch oder radiologisch abnorm verändert zeigt</p>
wahrscheinliche IA	<p>mindestens ein patientenbezogener Risikofaktor</p> <p>und</p> <p>ein mikrobiologisches Kriterium</p> <p>und</p> <p>ein klinisches Major- oder 2 klinische Minorkriterium</p> <p>mindestens ein patientenbezogener Risikofaktor</p>

mögliche IA und
ein mikrobiologisches Kriterium
oder
ein klinisches Major- oder 2 klinische Minorkriterium

Patientenbezogene Risikofaktoren:

- Neutropenie von $<500/\mu\text{l}$ für >10 Tage
- persistierendes Fieber $>38^\circ\text{C}$, $>96\text{h}$ refraktär der Behandlung mit Breitbandantibiotika
- Körpertemperatur entweder $>38^\circ\text{C}$ oder $<36^\circ\text{C}$ dazu einer der folgenden Bedingungen: prolongierte Neutropenie (>10 Tage) in den letzten 60 Tagen, immunsupprimierende Behandlung in den letzten 30 Tagen, invasive Pilzinfektion in einer vorherigen Neutropeniephase oder bestehende AIDS-Erkrankung.
- GvHD-Symptome
- Therapie mit Kortikosteroiden für > 3 Wochen

Mikrobiologische Kriterien:

- positive Kultur für Aspergillus aus Sputumflüssigkeit und/oder BAL-Proben
- positive Kultur oder Mikroskopie aus Sinus-Aspirat
- positives Ergebnis von Aspergillus-Antigen in BAL, Liquor oder >2 Blutproben

Klinische Kriterien:

Sie müssen zu den mikrobiologischen und patientenbezogenen Kriterien in Beziehung stehen.

- Major-Kriterien: in der CT neu aufgetretene Infiltrate mit folgender aspergillus typischer Beschreibung: halo sign, air-crescent sign oder Kavernenbildung

Radiologische Zeichen einer invasiven Sinusitis

Radiologische Zeichen einer ZNS-Infektion

- Minor-Kriterien: Symptome einer unteren Atemwegsinfektion, bei der Auskultation Pleurareiben, alle neu aufgetretene Lungeninfiltrate, die die Major-Kriterien nicht erfüllen, Pleuraerguss

Symptome einer oberen Atemwegsinfektion

Fokale neurologische Symptome, Bewusstseinsveränderungen,

Meningismus, Liquorveränderungen

1.2.2 Krankheitsbilder bei IA

Für die meisten Menschen stellen Pilzinfektionen keine Gefahr dar. Das ist vor allem einem intaktem Phagozyten-Makrophagen-System und somit einer funktionierenden Immunabwehr zuzuschreiben. Patienten die durch eine Krebserkrankung oder einer Stammzelltransplantation immungeschwächt sind, verfügen nicht mehr über diesen Schutz und Pathogene können barriereelos in den Körper, vor allem über die Atemwege, die Haut, den Gastrointestinaltrakt u.a. eindringen und zu schweren Krankheitsbildern führen.

(Denning,1998; van Burik et al.,1998a; Rowen et al.,1995; Larkin et al., 1996)

Vier Formen der IA werden unterschieden (Latge,1999):

- akute oder chronische pulmonale IA (häufigste Form)

- Tracheobronchitis und obstruktive Bronchitis (v.a. bei AIDS-Patienten vorkommend)
- akute invasive Rhinosinusitis
- disseminierte Erkrankung (meist Befall von Gehirn, Haut, Auge, Niere, Herz u.a.)

1.2.3 Krankheitsbilder bei immunkompetenten Patienten

Das Krankheitsbild bei immunkompetenten Patienten sieht anders aus, hier kommt es zu keiner Invasion oder Dissemination, aber zum Pilzbefall eines Organs.

Bei Asthma- oder Mukoviszidosepatienten kann es zur Allergisch Bronchopulmunaler Aspergillose kommen, welche sich durch Bronchialasthma und radiologisch nachgewiesenen Lungeninfiltraten kennzeichnet und sich zu Bronchiektasen und Lungenfibrose entwickeln kann. Die Therapie besteht aus Kortison.

Außerdem können beim Immunkompetenten Aspergillome auftreten, diese entstehen in präformierten Lungenhohlräumen z.B. nach einer Tuberkuloseerkrankung oder einer Sarkoidose. Häufige Symptome beim Aspergillom sind Hämoptysen. Das Aspergillom erscheint im Röntgenbild als kugelförmige Masse, die von einer Verschattung umgeben ist und verdickte Pleuramembranen aufweist. (Munoz et al.2006;Stevens et al.,2000;Latge,1999)

1.3 *Epidemiologie*

Die Epidemiologie setzt sich aus Inzidenz, Mortalität, Pathogenese, Klinik, Risikogruppen und –faktoren zusammen. Diese werden im Folgenden erläutert.

1.3.1 Inzidenz

Angaben zur Inzidenzrate schwanken in der Literatur in hohem Maße, dies ist nicht nur auf die schwierige Diagnostik und unklare Klinik zurückzuführen,

sondern auch darauf, dass viele Aspergilloseerkrankungen erst bei einer Autopsie, d.h. nach dem Tode nachgewiesen werden. Das erklärt auch die Wichtigkeit von präventiven Maßnahmen. (Hawkins et al.,1984; Van Belkum et al.,1993; Spiess et al.,2003; Munoz et al.,2006)

Einigkeit herrscht darüber, dass die Inzidenz von IA in den letzten Jahrzehnten dramatisch angestiegen ist während Pilzinfektionen, die durch Candida-Spezies, aufgrund der konsequenten und effektiven Therapie weit gesunken ist. (Martino et al.,2002; Bissinger et al.,2006)

So ist die Inzidenz von Pilzinfektionen seit den 70er Jahren von 12% auf 30% gestiegen, am häufigsten sind dabei Patienten betroffen, die sich einer Knochenmarkstransplantation unterzogen haben. (Bhatti et al.,2006;Einsele et al.,2001; Pfaffenbach et al.,2000; Patterson et al.,2000)

Mit 80% stellt die IA dabei die weltweit verbreitetste invasive Mykose dar, wobei sich bei 90% dieser Infektionen *Aspergillus fumigatus* nachweisen lässt, gefolgt von den Spezies *A.flavus*, *A.terreus*, *A. niger* und *A. nidulans*. (Latge,1999)

Durch Zunahme der Patientenzahlen, die am anfälligsten für eine IA sind lässt sich diese Inzidenzrate erklären. Chemotherapien bei soliden Organumoren werden immer häufiger angewendet, Transplantationen in zunehmender Zahl durchgeführt, es gibt immer mehr AIDS-Patienten und das Behandlungsspektrum einer immunsuppressiven Therapie weitet sich auf zahlreiche Krankheiten aus. (Singh, 2001; Denning,1998)

1.3.2 Mortalität

Eine besorgniserregende Gegebenheit ist die immer wieder beschriebene hohe Mortalitätsrate bei einer invasiven Aspergillose. Sie liegt zwischen 60%-90% kann aber bei hämatologischen Patienten 100% ausmachen. (Einsele et al.,1997; Hebart et al.,2003; Marr et al.,2002b; Latge,1999;Jantunen et al.,2002)

Bei einer Studie lagen die Letalitätsraten für cerebrale Aspergillose bei 99%, für Lungenaspergillose 86% und für Sinusaspergillose 66%, trotz antimykotischer

Therapie. Die Gründe hierfür sind die noch immer die nicht ausreichend effektive Therapie, außerdem sind die eingesetzten Medikamente überaus toxisch. Auch gibt es bisher keine etablierten Standards oder Leitlinien mit der sich eine bessere Heilungsrate erzielen lässt. (Lin et al.,2001; Wiederhold et al.,2003; Ullmann et al.,2006)

Der wichtigste Faktor für das Überleben einer IA ist, dass die Diagnose möglichst früh gestellt wird und dann adäquat behandelt wird. (Loeffler et al., 2001; Kami et al.,2001; Maschmayer et al.,2003; Denning et al.,2003)

Daher kommt der Forschung, für neue Diagnostikmethoden, die sensibel und spezifisch genug sind und zudem einfach durchführbar sind, eine große Bedeutung zu. (Aisner et al.,1977;Hebart et al.,2000a; Muller et al.,2002)

1.3.3 Pathogenese

Hauptsächlich gelangen Aspergillussporen über die Atemluft in die Lunge, wo sie aufgrund ihrer geringen Sporengröße von 2-3µm bis in die Alveolen vordringen können. Sie wachsen und bilden Hyphen aus. Ihre Konidien haben die Fähigkeit über verschiedene Adhäsine an Schleimhautoberflächen zu binden. Dies erklärt warum gerade immunsupprimierte Patienten an IA erkranken, bei Gesunden würde neutrophile Granulozyten die Sporen phagozytieren und somit eliminieren. Dadurch ergibt sich eine größere Gefahr für diese Patienten, wenn sie einer erhöhten Sporenbelastung z.B. Umbaumaßnahmen im Krankenhaus oder Blumentöpfen ausgesetzt sind.

(Denning,1998; Trevino-Castellano et al.,2003; Denning et al.,2003)

Anderer Eintrittspforten können Hautdefekte, liegende zentralvenöse Katheter, Verbrennungen oder Lebensmittel sein. Hämatogene Invasion und Dissemination der Organe sind möglich. (Denning,1998; Segal et al.,2006)

1.3.4 Klinik

Die klinische Manifestation ist unspezifisch, je nach befallenem Organ variieren die Symptome. Die Lunge ist dabei am häufigsten betroffen. Zumeist treten

therapieresistentes und prolongiertes Fieber, Husten, Hämoptysen, Dyspnoe und Thoraxschmerzen auf. (Florent et al.,2006; Einsele et al.,2000; Caillot et al.,1997; Gerson et al.,1985)

Sollten Kopfschmerzen, Bewusstseinsveränderungen, Nervenausfälle oder Krampfanfälle hinzukommen, kann dies auf eine zerebrale Aspergillose hinweisen, welche bei 10-20%. Bei neutropenischen Patienten wird vereinzelt auch ein kutane Form der Aspergillose diagnostiziert, dass sich durch ein schnell wachsendes Erythem mit Nekrosen und Ulzerationen manifestiert.

In 20-30% der Aspergillosefälle treten keinerlei Symptome auf und bleiben daher klinisch unerkannt.

Um beurteilen zu können, ob es sich um eine IA handelt müssen daher verschiedene Diagnosekriterien angewandt werden, zudem sollte der Kliniker differentialdiagnostisch auch andere Erkrankungen ausschließen. (Lau et al.,2006; Denning,1998; Einsele et al.,1997; Larkin et al.,1996)

1.3.5 Risikogruppen

Da die Aspergillose eine opportunistische Infektion darstellt, sind folglich die Patienten von ihr am ehesten betroffen, deren Immunsystem nur eingeschränkt funktionstüchtig ist. Somit sind unterschiedliche Krankheitsbilder in der Risikogruppe vertreten. Die meisten Patienten sind die vor und nach einer Knochenmarkstransplantation, Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen, Patienten nach soliden Organtransplantationen, AIDS-Patienten und Patienten mit Lungenerkrankungen. (Patterson et al.,2000)

Aber auch andere Autoimmunerkrankungen, metabolische Störungen, größere Operationen oder Verbrennungen führen zu einer Immunsuppression und damit zur Risikoerhöhung an eine Aspergillose zu erkranken. Häufigste Ursache der Immunsuppression liegt in diesen Fällen in der Langzeit-Therapie mit Kortikosteroiden und zytotoxischen Chemotherapeutika. (Loeffler et al.,1999; Baddley et al.,2001; Soubani et al.,2002; Loeffler et al.,2002b)

Ein hohes Risiko, d.h. ein Risiko von mehr als 10% liegt bei Patienten vor nach allogener Knochenmarkstransplantation mit einer starken GvHD, bei Patienten mit AML, mit einer chronisch granulomatösen Erkrankung und nach Lungentransplantation. Nach allogener KMT zeigte sich eine bimodale Risikosteigerung. Zum einen kam es zu vermehrten Infektionen in der frühen Phase nach Transplantation um den 16. Tag und ebenso in der langandauernden immunsuppressiven Phase um den 96. Tag nach Transplantation. Mittleres Risiko besteht bei AIDS-Patienten, bei autologer KMT oder allogener KMT ohne GvHD, Lymphom- und Verbrennungspatienten. Diabetes mellitus Patienten und Patienten mit systemischen Lupus erythematoses haben dagegen ein eher niedriges Risiko unter 1%. (Wald et al.,1997; Einsele et al.,2001; Martino et al.,2002; Stevens et al.,2002; Wiederhold et al.,2003; Bhatti et al., 2006; Munoz et al.,2006)

1.3.6 Risikofaktoren

Die unterschiedlichen Risikogruppen unterliegen verschiedenen Faktoren, die das Risiko an eine IA zu erkranken bemessen. Jeder Patient hat somit ein individuelles Risiko.

Der bedeutenste Risikofaktor wird der Neutropenie und deren Ausmaß und Dauer zugeschrieben. Umso länger die Neutropeniephase anhält desto öfter wird eine IA beobachtet.

Art und Stadium der zugrunde liegenden Erkrankung definieren weiterhin die Höhe des Risikos. 24% der AML Patienten erkranken an einer IA während es bei den Plasmazytompatienten nur 2,5% sind. (Pfaffenbach et al.,2000)

Bei Transplantationspatienten hängt das Risiko im wesentlichen davon ab, welche Form der Transplantation gewählt wird, wie sehr die HLA-Kompatibilität übereinstimmt und ob eine T-Zell-Depletion der Donorzellen durchgeführt wurde. Des Weiteren spielen stattgefundene Komplikationen während des stationären Aufenthaltes und die Intensität der vorherigen Behandlung eine Rolle. Letztendlich beeinflussen auch das Alter des Patienten und die

Unterbringung in Hochfiltrerräumen zum Schutz vor Infektionen die Risikoabschätzung für eine Infektion. (Halliday et al.,2006; Einsele et al.,2003; Thursky et al.,2004; Marr et al.,2002; Skladny et al.,1999; Schlegel,2001)

1.4 Diagnostik

1.4.1 Allgemein

Die Diagnostik der Invasiven Aspergillose stellt bis heute ein großes Problem dar. Sie ist häufig nicht einfach durchführbar und uneindeutig. Schwierigkeiten sind vor allem in der Frühdiagnostik zu beobachten, wo die verschiedenen Methode nicht sicher überzeugen können. Dabei ist bekannt, dass das Überleben des Patienten mit dem frühzeitigen Nachweis einer Infektion in Beziehung steht. Patienten werden daher zu spät behandelt und die Prognose verschlechtert sich.

Zum Nachweis von Aspergillen dienen hierbei laborchemische, radiologische und serologische Untersuchungen. Den molekularbiologischen Methoden, wie z.B. dem DNA-Nachweis mittels PCR, kommen immer größere Bedeutung zu. Der kulturelle oder histologische Nachweis stellt den sichersten Beweis einer Aspergilloseerkrankung dar.

Um eine Diagnose finden zu können, werden daher mehrere Verfahren angewendet und unter Einbeziehung der Klinik des Patienten und dessen Risiko bewertet. (Skladny et al.,1999; Denning,1998; Aisner et al.,1977; Janssen et al.,1996; Gulbahce et al.,2004; Chamilos et al.,2006)

1.4.2 Radiologische Befunde

Zur Anwendung kommen das konventionelle Röntgen, die CT bzw. HRCT und bei entsprechender Fragestellung auch die MRT.

Als radiologisch typischen Befund werden in der Lunge noduläre oder fleckige Infiltrate beschrieben, die oftmals pleuranah liegen und ein zuführendes Gefäß aufweisen. Kommt es um das Infiltrat zur Ödembildung oder Einblutung entsteht

dort zu einer erhöhten Strahlentransparenz, die als halo sign oder Haloeffekt bezeichnet wird. (Caillot et al.1997;Ruhnke et al.2003;Althoff Souza et al.2006)

Kommt es innerhalb eines Konsolidierungssegment zur Kavernenbildung wird dies ebenfalls als Zeichen einer Aspergillose gewertet. In einigen Fällen verdichten sich diese Mycetome und bilden eine Luftsichel um sich aus, die als air crescent sign bezeichnet wird. Dies wird aber erst in der Spätphase der Infektion beobachtet. (Geftter et al.,1985; Kami et al.,2001)

Das Problem ist, dass häufig keine Veränderungen bei vorliegender Erkrankung sichtbar werden. Die Veränderungen sind zudem im Frühstadium oftmals unspezifisch, hier bietet die CT bzw. HRCT Vorteile gegenüber dem konventionellem Röntgen. (Einsele et al.,2001)

Bei cerebraler Aspergillose können CT oder MRT zur Befundung zu Rate gezogen werden. (Denning,1998; Brown et al.,2006; Munoz et al.,2006)

1.4.3 Histologie

Als eine der sicheren Verfahren gilt die zytologische Beurteilung von gewonnenem Material unter dem Mikroskop. Die Probe wird zunächst gefärbt, um die Aspergillen darzustellen. Unter dem Mikroskop sind sie radiär in Kolonien angeordnet, bestehen aus 7-10µm große Hyphen und haben ein dichotom verzweigtes septiertes Myzel. (Ruhnke et al.,2003)

Als Materialien können Biopsie- und Abstrichpräparate entnommen werden, sowie Blut, Liquor, BAL, Sputum und andere Körperflüssigkeiten. Dabei muss darauf geachtet werden, dass unter sterilen Bedingungen entnommen wird, um mögliche Kontaminationen auszuschließen. Das Problem bei dieser Methode besteht daher darin, dass keine Unterscheidung zwischen Kontamination, Besiedlung und Invasivität getroffen werden kann.

Außerdem sind invasive Methoden wie z.B. eine Biopsie bei schwerkranken Patienten kontraindiziert und können nicht durchgeführt werden. (Bissinger et al.,2006; Stevens,2002; Hebart et al.,2000a; Einsele et al.,2000)

1.4.4 Kultur

Für dieses Nachweisverfahren werden zunächst Gewebeproben oder Abstriche entnommen, meistens werden BAL-Flüssigkeit und Sputum analysiert. Die kulturelle Anzucht liefert schon nach wenigen Tagen Auskunft darüber, ob es zum Aspergilluswachstum kommt. Die Methode liefert jedoch eine geringe Spezifität wie Sensitivität und ist anfällig für Kontaminationen und falsch negativen Resultaten.

(Munoz et al.,2006; Loeffler et al.,2002b; Loeffler et al.,1997; Einsele et al.,2000; Einsele et al., 1997; Wald et al.,1997)

1.4.5 Antigennachweis

Als Antigene werden zum einen Galaktomannan und zum anderen (1→3)- β -D-Glucan als Zellwandbestandteile des Pilzes nachgewiesen. Eine hohe Sensitivität erreicht der Nachweis von Galaktomannan durch einen ELISA-Test. Ein monoklonaler Antikörper richtet sich dabei gegen zirkulierendes Galaktomannan von *Aspergillus fumigatus* und bindet daran. Nachteil dieses Verfahrens ist die hohe Rate an falsch positiven Ergebnissen, die bei 15% liegt. (Costa et al.,2002; Alexander,2002; Rantakokko-Jalava et al.,2003; Mennik-Kersten et al.,2004; El Mahallawy et al.,2006)

Ein weiteres Verfahren für die Galaktomannananalyse ist der Latex-Agglutinationstest.

Beide Methoden werden seriell, d.h. mehr als zweimal in der Woche angewandt, da die Pilzantigene diskontinuierlich abgegeben werden und die Detektion somit verbessert werden kann. (Hahn et al.,2001; Stevens et al.,2002; Verdaguer et al.,2006)

Das Polysaccharid β -D-Glucan wird mit Hilfe eines Gerinnungsenzyms nachgewiesen. Da jedoch β -D-Glucan nicht spezifisch für *Aspergillus* ist, werden auch andere Erreger, u.a. *Candida*, *Pneumocystis carinii* und *Cryptococcus* positiv getestet. (Kawazu et al.,2004; Kami et al.,2001)

1.4.6 Antikörpernachweis

Für den Antikörpernachweis stehen verschiedene Testverfahren zur Verfügung. Meist verwendete Methoden sind ein indirekter Hämagglutinationstest, eine Immunfluoreszenz- und ein ELISA-Analyse. Diese Verfahren haben den großen Nachteil eine sehr schlechte Sensitivität vorzuweisen. Außerdem ist die Anwendung bei hämato-onkologischen Patienten eingeschränkt, da sie bedingt durch ihre Grunderkrankung eine gestörte Antikörperbildung besitzen. Wenn jedoch bei diesen Patienten Antikörper nachgewiesen werden, dann hat dies eine Verbesserung der Prognose zur Folge. Ein weiterer Nachteil stellt die erst späte Nachweisbarkeit von Antikörpern bei z.B. Organtransplantierten dar. Daher wird der Antikörpernachweis nur noch selten angewandt. (Florent et al.,2006; Stevens et al.,2002; Golbang et al.,1999; Latge,1999; Denning,1998; Van Burik et al.,1998b)

1.4.7 Nachweis von Aspergillus-DNA mittels PCR

Bei der Polymerase Chain Reaction/PCR wird die gesuchte Genregion durch die Wahl der Primer amplifiziert und danach mit einer geeigneten Methode analysiert. Diese können zum einen ELISA-Verfahren sein, aber auch auf Immunfluoreszenzbasis bestehen. Für die Diagnostik kommen aspergillus-spezifische Primer zur Anwendung, aber auch panfungale Primer, die Aspergillus nicht spezifisch testen. Die Primer testen Genregionen, die möglichst stabil und hochkonserviert vorliegen, z.B in der 18S-rRNA als Multicopygen, mitochondriale DNA-Bereiche oder die ITS-Region. Konventionelle PCR-Techniken stehen Real-Time-PCR-Methoden gegenüber.

Probenmaterial für die PCR-Diagnostik kann aus Blut oder BAL entnommen werden.

Die PCR-Technik stellt eine moderne und vielversprechende Methode für die Aspergillusdiagnostik dar. Die Entwicklung neuerer und besserer Verfahren schreitet stetig voran. Großer Vorteil der PCR ist ihre einfache Durchführbarkeit und schnelle Diagnostik. Einige Methoden lassen sogar eine quantitative

Aussage der Pilzlast zu. Viele Studien brachten für Spezifität und Sensitivität schon sehr gute Ergebnisse. Problem stellt die Anfälligkeit für Kontaminationen dar. Die Proben für dieses Verfahren werden ebenfalls seriell abgenommen. (Dean et al.,2006; Imhof et al.,2003; Pryce et al.,2003; Spiess et al.,2003; Bretagne,2003; Loeffler et al.,2002a;Costa et al.,2002; Lass.Floerl,2001; Skladny et al.,1999; Williamson et al.,1999; Reiss et al.,1998; Loeffler et al.,1998)

1.5 Therapie

Die Therapie von invasiven Aspergillosen stellt sich als schwierig heraus. Nicht nur die Tatsache, dass die Symptome der Patienten unspezifisch sind und nicht sicher auf eine Aspergillose deuten, sondern auch die unzureichenden Diagnosemöglichkeiten, machen es schwer einen klaren Behandlungsstandard zu finden. Es gibt daher prophylaktische, empirische und präemptive Behandlungsstrategien. (Segal et al.,2006;Einsele et al.,2000; Hebart et al.,2000c; Bennett et al.,2003)

Dabei werden Antimykotika häufig empirisch eingesetzt. Neutropenische Patienten mit antibiotika-refraktären Fieber, das nicht zurückgeht, werden dann mit Antimykotika behandelt. Kliniker warten daher oft die Ergebnisse der Labordiagnostik nicht ab und Behandeln auf klinischen Verdacht. Entscheidend ist der möglichst frühe Beginn der Therapie bei einer Aspergillose. Die Prognose wird dadurch in erheblichen Ausmaß beeinflusst. Ohne Therapie besteht in den meisten Fällen ein tödlicher Ausgang der Infektion und auch unter Therapie ist das Ansprechen auf die Behandlung bei den immungeschwächten Patienten gering. Die Nebenwirkung der zur Verfügung stehenden Medikamente stellt ein weiteres Problem in der Therapie von Hochrisikopatienten dar. Dennoch kommen eine Reihe von Medikamenten für die Therapie in Frage. (Ullmann et al.,2006;Wheat,2003; Spiess et al.,2003; Subira et al.,2002; Marr,2002; Einsele et al.,1997;)

1.5.1 Amphotericin B

Amphotericin B ist ein Polyenmakrolid und ist das am häufigsten eingesetzte Antimykotikum. Seine Wirkung beruht auf die Störung der Pilzmembranfunktion. Es bindet an das Ergosterol der Membran und verursacht dort eine erhöhte Durchlässigkeit, dadurch wird der Zelltod ausgelöst.

Amphotericin B ist Mittel der Wahl bei invasiven Aspergillosen. Es besitzt ein breites Wirkspektrum, kann parenteral gegeben werden und weist kaum Resistenzen auf. Probleme der Behandlung stellen die geringe Effizienz dar sowie vielzählige Nebenwirkungen, das den Einsatz, v.a. bei immungeschwächten onkologischen Patienten einschränkt. Die wichtigste Nebenwirkung ist die Nephrotoxizität, die auch zu irreversiblen Schädigung des tubulären Systems der Niere führen kann. Außerdem ist Amphotericin B schlecht verträglich, so kann es zu Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Schüttelfrost, Fieber, gastrointestinale Beschwerden und sogar zu Anämie, Leukopenie und Agranulozytose kommen. An der Infusionsstelle einer peripheren Vene werden Thrombophlebitiden beobachtet. Kontraindikationen stellen schwere Leber- und Niereninsuffizienz dar. Die Schwere der Nebenwirkungen werden durch Dauer und Ausmaß der Behandlung sowie die Begleitmedikation des Patienten bestimmt. (Ullmann et al.,2006;Patterson et al.,2000; Dismukes,2000; Ruhnke,2000)

Die Toxizität von Amphotericin B lässt sich durch die Abreichungsform erklären. Es muss um an den Wirkort zu gelangen mit Natriumdesoxycholat versetzt werden. Das hat dazu geführt, dass neuere besser verträglichere Formen von Amphotericin B entwickelt wurden. Zum Beispiel wird es an ein Lipidkomplex gebunden oder als liposomales Präparat hergestellt. Dadurch wird erreicht, das höhere Konzentrationen an den Wirkort gelangen und die Toxizität gleichzeitig geringer ausfällt. Durch die hohen Therapiekosten der lipid-assoziierten Präparate werden diese erst bei Unverträglichkeit des konventionellen Amphotericin B, bei erhöhten Kreatininwerten und bei Komedikation mit nephrotoxischen Medikamenten verabreicht. (Segal et al.,2006; Einsele et al., 2000; Dismukes,2000; Maschmayer et al.,2003; Bennett et al.,2003)

1.5.2 Itraconazol und Voriconazol

Itraconazol und Voriconazol gehören zu der Gruppe der Azolderivate. Sie greifen ebenfalls in der Störung der Membranfunktion ein, indem sie die Ergosterolsynthese hemmen. Dabei blockieren sie Cytochrom-P₄₅₀-abhängige Enzyme, u.a. die 14- α -Demethylase. Somit besitzen auch sie ein breites Wirkspektrum, wobei Voriconazol stärkere Wirksamkeit gegen Aspergillen zeigt. (Simitsopoulou et al.,2006; Ruhnke et al.,2003; Maschmayer et al., 2003)

Nebenwirkungen sind Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, allergische Symptome bis hin zu Transaminasenerhöhung und Hepatotoxizität. Aufgrund ihres Wirkmechanismus kann es zu Störungen der Steroidsynthese kommen. Schwangerschaft und Stillzeit stellen Kontraindikationen für die Verabreichung von Itraconazol bzw. Voriconazol dar. Auf mögliche Interaktionen mit anderen Medikamenten muss besonders geachtet werden und auch der Blutspiegel sollte kontrolliert werden, da die Bioverfügbarkeit starke Schwankungen aufweist. Daher konnten diese Präparate sich noch nicht gegenüber Amphotericin B behaupten. (Einsele et al.,2000; Stevens et al.,2000; Steinbach et al.,2003; Baden et al.,2003; Ruhnke et al.,2003; Karow et al.,2004)

1.5.3 Caspofungin

Aus der Gruppe der Echinocandine stammt dieses neuere Medikament, das noch Gegenstand von klinischen Studien ist. Es wirkt fungizid, indem es die Synthese von β -(1,3)-D-Glucan inhibiert. β -(1,3)-D-Glucan ist Hauptbestandteil der Pilzzellwand, somit kommt es zur osmotischen Instabilität und Lyse der Zelle. Nebenwirkungen sind Phlebitiden, Fieber, Übelkeit, Erbrechen. Als Folge der Interaktion mit anderen Mitteln kann es zu Leberwerterhöhung kommen. Kontraindikationen stellen hier Schwangerschaft und Stillzeit dar. Caspofungin kommt erst bei unzureichendem Ansprechen auf Amphotericin B oder Itraconazol oder bei Unverträglichkeiten zum Einsatz. (Einsele et al.,2001; Keating et al.,2001; Karow et al.,2004)

1.5.4 Immunmodulatoren

Zusätzlich können hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie G-CSF, GM-CSF oder auch G-CSF und steroid-mobilisierende Granulozyten verabreicht werden, um die adaptive Immunantwort zu stärken. Ziel dieser Behandlung ist es die Phase der Neutropenie zu verkürzen und die hämatopoetische Rekonstitution zu beschleunigen. (Simitsopoulou et al.,2006; Einsele et al.,2000; Tabbara et al.,2002; Denning,1998)

1.5.5 Chirurgische Resektion

Nutzen ziehen Patienten in der chirurgischen Entfernung von Aspergillomen oder anderen abgekapselten Herden. Dies erbringt eine signifikante Verbesserung der Prognose. (Gow et al.,2003)

1.6 Prophylaxe

Allgemeine Maßnahmen sollten zur Expositionsprophylaxe getroffen werden, da Aspergillen grundsätzlich überall vorkommen und die Patienten nicht übermäßig den Pilzen ausgesetzt sein sollten. Immungeschwächte Patienten werden daher in Hochfiltrerräume isoliert. Bei Bautätigkeit kommt es zu einer erhöhten Sporenbelastung, Risikopatienten sollten dem nicht ausgesetzt werden. Das Personal muss Hygieneregeln streng befolgen. Diese beinhalten das Tragen von Kitteln, Mundschutz und Handschuhen. Außerdem müssen Desinfektionsmaßnahmen ergriffen werden. (Mantadakis et al.,2006; Baddley et al.,2001; Denning,1998)

Für eine medikamentöse Prophylaxe konnte bisher noch keine entgeltige Aussage gemacht werden und wird im klinischen Alltag meistens nicht angewandt, da der Nutzen dieser Strategie noch nicht geklärt ist und die Toxizität der Mittel problematisch ist. Dagegen wird die sekundäre Prophylaxe bei Patienten mit vorheriger invasiver Aspergillose empfohlen. (Morrissey et al.,2006; Ruhnke et al.,2003; Lortholary et al.,1997)

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Da die Inzidenz von invasiven Aspergillosen in den letzten Jahrzehnten dramatisch angestiegen ist und die Mortalitätsrate noch immer extrem hoch liegt, kommt der Verbesserung der Diagnosemöglichkeiten eine herausragende Rolle zu. Der entscheidende Faktor, der die Prognose des Patienten grundlegend beeinflusst, ist der Zeitpunkt der Diagnose und damit der Therapiebeginn. Umso früher eine invasive Aspergillose erkannt wird desto besser sind die Chancen des Patienten zu überleben.

Daher ist es Ziel dieser Arbeit eine Verbesserung der Diagnosemöglichkeiten zu erreichen und nicht nur schneller, sondern auch eindeutig eine Diagnose zu stellen, um dann eine adäquate Therapie anschließen zu können. Wenn genau feststeht welches Pathogen die Infektion verursacht, kann mit der richtigen Wahl der Therapie reagiert werden.

In den letzten Jahren kommt molekularbiologischen Methoden immer größere Bedeutung zu. Bei der Aspergillusdiagnostik bietet die Genomuntersuchung mittels PCR eine aussichtsreiche und erfolgsversprechende Methode dar. Die Durchführung gelingt einfach und schnell, sie kann überall vorgenommen werden und liefert sichere Ergebnisse.

Deswegen konzentriert sich diese Arbeit auf den Vergleich von verschiedenen konventionellen PCR-Verfahren für die frühzeitige Diagnostik von *Aspergillus fumigatus* in Risikopatienten. Es wurden dabei der in der Klinik routinemäßig eingesetzte Panfungal-Primer, der nicht aspergilluspezifisch ist mit den aspergilluspezifischen Primern AfLC2 und TS2 verglichen. Ziel war es diese Primer für den Routinegebrauch in der Klinik zu etablieren und ihre Spezifität sowie Sensitivität für die Detektion von *Aspergillus*-DNA zu analysieren. Die verwendeten Blutproben wurden im Krankheitsverlauf von Risikopatienten abgenommen und damals alle im Rahmen einer ersten Testung positiv für *Aspergillus* getestet und dann eingefroren. Damit konnte auch eine Verlaufsanalyse mit den jeweiligen Primer vorgenommen werden. Ein weiteres

Ziel war es die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der ersten Testung festzustellen.

2 Material, Methoden und Patienten

2.1 Material und Bezugsquellen

2.1.1 Geräte

Die folgende Tabelle veranschaulicht die verwendeten Geräte.

Tabelle 2: Geräte

Geräte	Hersteller, Ort
Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer, Foster City, USA
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Foster City, USA
ELISA Reader Rainbow	SLT, Craisheim
ELISA Rüttler	SLT, Craisheim
Gelelektrophorese LKB GPS 200/400	Pharmacia
Gelwanne Horizon 11.14	BRL
Sterilbank Hersafe	Heraeus, Hanau
Hybridisierungssofen	Bachhauer, Reutlingen
Vortex Mixer	Neo Lab 7-2020
Vortex Mixer	Bachhofer, Reutlingen
Vortex Genie 2TM	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Horizontalwippe	Hoefler, San Francisco
Sartorius Universal Waage U4800P	Sartorius,
Ständer Gel Cashing System 11-14	GiBcoBRL Life Technologies

2.1.2 Verbrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsgegenstände und weitere Hilfsmaterialien, die zur Durchführung der molekularbiologischen Versuche herangezogen wurden, sind in der unten aufgeführten Tabelle eingehend aufgelistet.

Tabelle 3: Verbrauchsgegenstände und –materialien

Gegenstände	Hersteller, Ort
PCR Master Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Primer	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	
Steriles Wasser	
PCR-ELISA Kit (DIG-Labeling)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR-ELISA Kit (DIG-Detection)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Falcon-Tubes 50ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Biozym, Oldendorf
Pipetten (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf
TAE-Buffer	Invitrogen Life Technologies, USA
Agarose	Sigma, Aldrich, Steinheim
GelStar	Cambrex Bio Science Rockland, Inc,

USA

Ready-Load 100bp DNA Ladder

Invitrogen Life Technologies, USA

BlueJuice Gel Loading Buffer

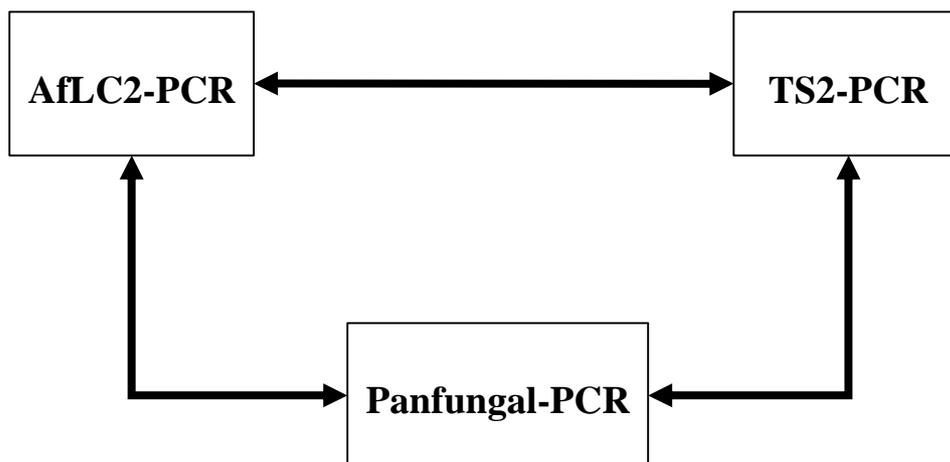
Invitrogen Life Technologies, USA

2.2 Methoden

Es wurden drei verschiedene Primerpaare für die *Aspergillus fumigatus* Diagnostik miteinander verglichen. Unter Anwendung einer konventionellen PCR Methode wurden der AfLC2- und TS2-Primer mit einer Gelelektrophorese und der Panfungal-Primer mit einem ELISA-Verfahren ausgewertet.

Die folgende Abbildung demonstriert modellhaft den Versuchsaufbau.

Abbildung 1:



2.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Proben standen aus der AMBISOME-Studie schon bereit, und wurden mit einer etablierten standardisierten Extraktionsmethode hergestellt.

2.2.2 Konventionelle PCR

2.2.2.1 Konventionelle PCR & PCR-ELISA mit dem Panfungal-Primer

Die Amplifikation der extrahierten DNA wurde mit einer etablierten PCR vorgenommen. Dazu wurden jeweils 10µl DNA zu 40µl PCR-Mastermix pipettiert.

Um das Risiko einer Übertragungskontamination gering zu halten, wurde der Mastermix in einem separaten Raum unter einer speziell dafür bestimmten Sterilbank pipettiert.

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

PCR ELISA (DIG-Labeling) Kit:

Tabelle 4 : PCR-Mastermix für den Panfugal-Primer

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 5: Zusammensetzung des 10fach Puffer für die PCR

Reagenz	Konzentration
Tris, ph 8,3	100 mM

KCL	500 mM
MgCl ₂	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'

Tabelle 6: Programm und Temperaturprofil für den Panfungal-Primer

Programm	FUNG
Denaturierung (initial)	94°C: 5min
Amplifikation	94°C :30sec
	62°C :1min
	72°C :2min
terminale extension	72°C :5min
Zyklen	35

2.2.2.2 Kontaminationsmonitoring

Um eventuelle Kontaminationen ausschließen zu können, wurde bei jeder PCR eine Negativprobe, bestehend aus 10µl destilliertem Wasser und 40µl Mastermix, mitgeführt.

2.2.2.3 Positivkontrolle

Als Positivkontrolle wurde bei jedem Durchgang eine Probe von Aspergillus-DNA in einer Verdünnung von entweder 10¹ oder bis 10⁶ mitgeführt.

2.2.2.4 Aspergillusspezifität

Um sicher zu gehen das der AfLC2- wie auch der TS2-Primer Aspergillus spezifisch testen und nicht wie der Panfungal-Primer Candida- und

Aspergillusarten nachweist, wurde bei jedem Durchgang eine Probe von Candida-DNA in einer Verdünnung von entweder 10^1 oder bis 10^6 mitgeführt.

2.2.2.5 PCR ELISA (DIG Detection) Kit

Der Nachweis von Pilz-DNA im ELISA wird erzielt, indem die PCR-Proben mit Dioxygenindesoxyuracilphosphat markiert werden.

Anschließend werden die Proben mit 3`Biotin markierten Oligonukleotiden von *Aspergillus fumigatus* hybridisiert.

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

Jede Probe wird mit 20 µl Denaturierungslösung versehen, vorgetextet, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich werden zur Hybridisierung 200µl Hybridisierungslösung zugegeben.

Hybridisierungslösung:

Der Ansatz enthält 200 µl Hybridisierungs-Puffer (Kit) und 2 pmol/ ml *Aspergillus fumigatus*-Oligonukleotidsonde pro Probe. Die Lösung für die Kontroll-DNA besteht aus 10ml in 1ml Hybridisierungs-Puffer.

Zum coating werden 200 µl des Gemisches in die einzelnen wells der ELISA-platte pipettiert, eine Schutzfolie (im Kit vorhanden) darauf angebracht und dann 3 h bei 40°C im Hybridisierungs-Ofen auf einem Schüttler inkubiert. Nach 3 h wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl Waschpuffer (Kit) dreimal gewaschen.

Nach der Adsorption des Antikörpers ist das Hybrid an der mit Streptavidin beschichteten Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden.

Es folgt die Inkubation. Dazu wird 200 µl Antikörperlösung (Anti-Dioxigenin-POD Konjugat) zu jeder Probe gegeben und 30 min bei 40°C auf dem Schüttler im Hybridisierungssofen gestellt.

Die Antikörperlösung wird mindestens 1 h vorher folgendermaßen hergestellt:

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

Der Überstand wieder verworfen und das Pellet sechsmal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen.

Für die Farbreaktion werden die Proben nun mit jeweils 200 µl Färbelösung versetzt. Es folgt eine erneute Inkubation unter einer Schutzfolie für 30 min bei 40°C auf dem Schüttler.

Die Färbelösung sollte mindestens 30 min vorher wie folgt hergestellt werden:

1 ABTS-Tablette (Kit) zu 5 ml Substratpuffer (Kit)

Die Messung erfolgt photometrisch im SLT Rainbow-Reader, bei 405 nm-Referenzfilter und 492 nm Wellenlänge.

2.2.2.6 Konventionelle PCR & Gelelektrophorese mit dem AfLC2- bzw. TS2-Primer

Hier wurde nach der Buchheidt-Studie (Buchheidt et al, 2003) die hierfür angewandte konventionelle PCR für den AfLC2- und den TS2-Primer angewandt.

Bei der AfLC2-PCR wurden 9µl DNA zu 41µl Mastermix pipettiert, bei der TS2-PCR 10µl DNA zu 40µl Mastermixlösung. Außerdem wurde bei der AfLC2-PCR eine Variation in der Magnesiumkonzentration des Mastermix vorgenommen, um eine Verbesserung der Sensitivität herzustellen.

Um auch hier das Übertragungsrisiko zu minimieren, wurde ebenfalls in einem separaten Raum der Mastermix pipettiert, und dabei Handschuhe, Mundschutz und Kittel getragen.

Positivkontrolle, Negativprobe und Aspergilluspezifität wurden gleichermaßen analysiert.

Tabelle 7 : PCR-Mastermix für den TS2-Primer

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

Forward-Primer:TS2A 5`-GCA GTC TGA GTT GAT TAT CGT AAT C-3`

Reverse-Primer:TS2B 5`-CGG CCG GGC CTA CAG AGC AGG TG-3`

Tabelle 8: PCR-Mastermix für den AfLC2-Primer

Reagenz	Konzentration/10 µl Probe
Aqua bidest.	15,5 µl
PCR-Master (PCR-Puffer,MgCl ₂ , dNTPs, Taq-Polymerase)	25 µl
Primer 1 und 2	0,5 ml

Forward Primer: AfLC2s 5`-AAT GCA CGA TAC TGT AGG ATC TG -3`

Reverse Primer: AfLC2as 5`-TGC ATT GGA TTA GCC ATA ACA -3`

Tabelle 9: Variation des PCR-Mastermix für den AfLC2-Primer

Reagenz	Konzentration/10 µl Probe
Aqua bidest.	5 µl
PCR-Master (PCR-Puffer, MgCl ₂ , dNTPs, Taq-Polymerase)	25 µl
Primer 1 und 2	0,5 ml
MgCl ₂	10,5µl

Tabelle 10: Programm und Temperaturprofil für den AfLC2- und TS2-Primer

Programm	BEATR
Denaturierung	95°C: 8min
Amplifikation	95°C : 4sec
Annealing	58°C : 8sec
Chain extension	72°C : 20sec
Zyklen	45

2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Genamplifikate der AfLC2- und TS2-PCR werden mit Hilfe von einer Gelelektrophorese aufgetrennt und unter einer Kamera dargestellt.

Herstellung des Agarosegels:

Zuerst werden 2g Agarosepulver in ein Glaskolben gegeben, zudem fügt man nun 10ml TAE-Puffer hinzu, welches zuvor auf 100ml mit Wasser aufgefüllt worden ist.

Die in Puffer und Wasser gelöste Agarose wird für 4min bei 600W in die Mikrowelle gestellt. Anschließend nach Auffüllen des verdampften Wassers noch einmal für 2 min.

Nun werden 10 μ l von dem Enzym GelStar hinzupipettiert und die fertige Gellösung in die dafür vorliegende Form gegossen.

Probenansatz:

Während das Gel aushärtet werden die Proben angesetzt. Dazu werden jeweils 10 μ l PCR-Produkt mit 2 μ l Loading Buffer vermischt und kurz gevortext.

Das hart gewordene Gel mit den geformten Taschen für die Auftrennung, wird nun in die Elektrophoresewanne gestellt, in der sich schon das DNA-Elektrophoresepuffer befindet.

Anschließend wird 5 μ l DNA ladder in die erste Tasche gegeben, der später die Banden zum Vergleich anzeigt.

In die weiteren Taschen werden die 12 μ l der angesetzten Proben pipettiert.

Auftrennung mittels Gelelektrophorese:

Bei 110-130 Volt werden die verschiedenen DNA-Fragmente aufgetrennt.

Die in der PCR mitgeführten Positivkontrolle, Negativprobe und Candidaprobe werden bei jedem Gelelektrophoresedurchgang analysiert.

Nach 30-50min ist die Auftrennung abgeschlossen und die einzelnen DNA-Bestandteile unterschiedlich weit gewandert.

DNA-Detektion:

Das Gel wird aus der Wanne genommen und zur Visualisierung unter die UV-Licht-Kamera gebracht und fotografiert.

2.3 Patienten

Von insgesamt 25 Patienten wurden während der AMBISOME-Studie im Zeitraum vom 14.07.1998 bis 20.02.2002 zwischen 1 bis 13 der abgenommenen Blutproben verwertet. Alle dieser Blutproben waren positiv in der PCR-ELISA getestet worden und danach eingefroren.

Alle Patienten wurden nach den Kriterien der AMBISOME-Studie in diese aufgenommen und waren durch ihre Immunsuppression nach einer PBSCT bzw. Chemo- und Strahlentherapie Hochrisikopatienten für eine Aspergillusinfektion.

14 Frauen und 11 Männer wurden in für diese Untersuchung ausgesucht. Das mittlere Alter betrug 33,56. Der älteste Patient war 60, der Jüngste 25 Jahre alt.

Alle Patienten erhielten eine Knochenmarktransplantation.

Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der Grundkrankheiten.

Tabelle 11:

Grunderkrankung	Anzahl der Patienten
AML	6
NHL	1
CML	6
ALL	2
CLL	1

Plasmazytom	3
MDS	1
MPS	2
Aplastisches Syndrom	1
Lymphom	1
Nierenzellkarzinom	1

Innerhalb des Behandlungszeitraums entwickelten 3 Patienten aspergillusverdächtige pulmonale Infiltrate.

Antimykotische, aspergilluswirksame Prophylaxe bzw. Behandlung bekamen 19 Patienten.

Von den 25 Patienten verstarben 6 Patienten bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes.

Die Patienten wurden nach der EORTC-Einteilung (Asciogu et al., 2002) in 3 Gruppen aufgegliedert.

22 Patienten erfüllten die Kriterien einer möglichen (possible) Aspergilloseerkrankung. Dies betraf 85 Blutproben. Bei all diesen Patienten trat Fieber auf zudem waren über 2 der abgenommenen Blutproben Aspergillusantigen positiv.

17 Patienten bekamen antimykotische Therapie.

Sichere Zeichen einer Aspergillose konnte nicht nachgewiesen werden.

4 Patienten dieser Gruppe verstarben im Laufe der Studie.

Bei 2 Patienten ließ sich ein wahrscheinlicher (probable) Aspergillosefall nachweisen.

1 Patient konnte der Gruppe der gesicherten (proven) Aspergillose zugeordnet werden.

Tabelle 12 stellt die Daten der Patienten mit sicherer und wahrscheinlicher Aspergillose dar:

Tabelle 12: Patientendaten, geordnet nach den EORTC-Kriterien, gesicherte und wahrscheinliche Aspergillose

Patienten- nummer	Grund- erkrank- ung	Klinische Daten und klinische Kriterien der Einteilung nach EORTC/ Konsensus	Pro- ben- zahl
Alter	Prognose	Antimykotische Therapie bzw. Prophylaxe	
Geschlecht			
1 Patienten mit sicherer Aspergillose:			
245	MDS	- PBSCT	7
50 Jahre		-Fieber in der Aplasie,Dyspnoe	
weiblich	Exitus	-radiologisch Aspergilloseinfiltrate im Segment 2 und 5 der rechten Lunge, Segment 4 links; -Bronchoskopie mit Gewebsbiopsie positiv -Breite antimykotische Behandlung	
2 Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose:			

168	CLL	- PBSCT	5
46 Jahre		-Fieber	
männlich	Exitus	-pulmonale pilztypische Infiltrate -Aspergillusantigen positiv in mehreren Blutproben	
436	AML	-Z.n. fremdallogene PBSCT	1
28 Jahre		- pulmonale pilztypische Infiltrate	
männlich	Entlassung	- Nachweis von Aspergillusantigen in Blutproben - hohes Fieber -GvHD -Breite antimykotische Therapie	

3 Ergebnisse

3.1 *Darstellung der Ergebnisse*

Insgesamt wurden 100 Blutproben, die durch die AMBISOME-Studie schon vorhanden und seitdem tiefgefroren waren, analysiert. Die Proben waren zum damaligen Zeitpunkt alle positiv getestet worden. In dieser Arbeit wurden sie sowohl in der PCR mit den Aspergillus spezifischen Primern TS2 und AfLC2 als auch in der PCR-ELISA mit dem Panfungal-Primer, untersucht.

3.1.1 **Darstellung der positiven Ergebnisse**

Tabelle 13: Darstellung der positiven Ergebnisse

PCR-ELISA	39 von 100 Proben positiv
Panfungal-Primer	(39%)
PCR-Gel	39 von 100 Proben positiv
TS2-Primer	(39%)
PCR-Gel	0 von 100 Proben positiv
AfLC2-Primer	(0%)

Tabelle 14: Darstellung der Übereinstimmungen

	Panfungal- Primer zu TS2-Primer	Panfungal- Primer zu AfLC2-Primer	TS2-Primer zu AfLC2-Primer
Übereinstimmungen der positiven Ergebnisse	19 von 39 positiven Proben (48,7%)	0 der 39 positiven Proben (0%)	0 der 39 positiven Proben (0%)

3.2 Ergebnisse der PCR-ELISA

3.2.1 Ergebnisermittlung mittels PCR-ELISA

Um die Bewertung eines Ergebnisses nach der PCR-ELISA durchführen zu können, wird bei jedem Lauf ein cut-off Wert berechnet. Hierfür wird der Durchschnitt aller im ELISA mitgeführten Negativkontrollen gebildet und mit drei multipliziert.

Eine Probe wird als positiv bewertet, wenn ihr Wert geteilt durch den berechneten cut-off, über eins liegt.

3.2.2 Gesamtergebnis der PCR-ELISA

Die PCR-ELISA ergab für 39 der 100 Proben ein positives Ergebnis, während 61 der 100 Proben negativ verblieben.

Im Rahmen der AMBISOME-Studie waren alle 100 Proben zuvor mit der selben Methode positiv getestet worden. Somit konnte bei dieser Untersuchung bei 39% ein wiederholt positives Ergebnis erzielt werden.

3.2.3 Ergebnis der PCR-ELISA in Bezug auf die Patienten

Tabelle 15 : Patientenproben mit positivem Ergebnis

Patientennummer	Einteilung nach EORTC/NIAID	Grund-erkrankung	Anzahl der positiv getesteten Proben	Anti-mykotika	Prognose
245	Gesicherte IA	MDS	7	ja	Exitus
168	Wahrscheinliche IA	ALL	3	ja	Exitus
436	Wahrscheinliche IA	AML	1	ja	Entlassung
434	Mögliche IA	CML	1	ja	Entlassung
444	Mögliche IA	AML	1	ja	Entlassung
536	Mögliche IA	CML	1	nein	Entlassung
314	Mögliche IA	MPS	2	ja	Entlassung
319	Mögliche IA	NZC	2	ja	Exitus

454	Mögliche IA	ALL	1	ja	Entlassung
289	Mögliche IA	CML	1	ja	Entlassung
449	Mögliche IA	Plas	1	ja	Entlassung
452	Mögliche IA	AML	2	ja	Entlassung
528	Mögliche IA	AA	1	ja	Entlassung
530	Mögliche IA	CML	2	ja	Exitus
161	Mögliche IA	AML	1	nein	Entlassung
243	Mögliche IA	ALL	2	nein	Entlassung
163	Mögliche IA	CML	7	nein	Entlassung
171	Mögliche IA	CML	4	nein	Entlassung

Somit wurden sowohl alle Proben (7 von 7) des Patienten mit gesicherter Aspergillose wieder positiv auf Aspergillus-DNA getestet, als auch 4 von 6 Proben der Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose.

3.3 PCR-Gel mit dem TS2-Primer

3.3.1 Ergebnisermittlung mittels PCR und Gel mit dem TS2-Primer

In der PCR sowie im anschließenden Gelverfahren wurde eine Aspergillus-DNA-Probe mitgeführt. Unter der UV-Licht-Kamera konnten man die markierten Banden darstellen, und im Vergleich zu den restlichen Proben als positiv oder negativ bewertet werden.

3.3.2 Gesamtergebnis

Mit dem TS2-Primer wurden 39 der 100 Proben positiv für Aspergillus-DNA getestet, in 61 der 100 Proben konnte keine Aspergillus-DNA nachgewiesen werden.

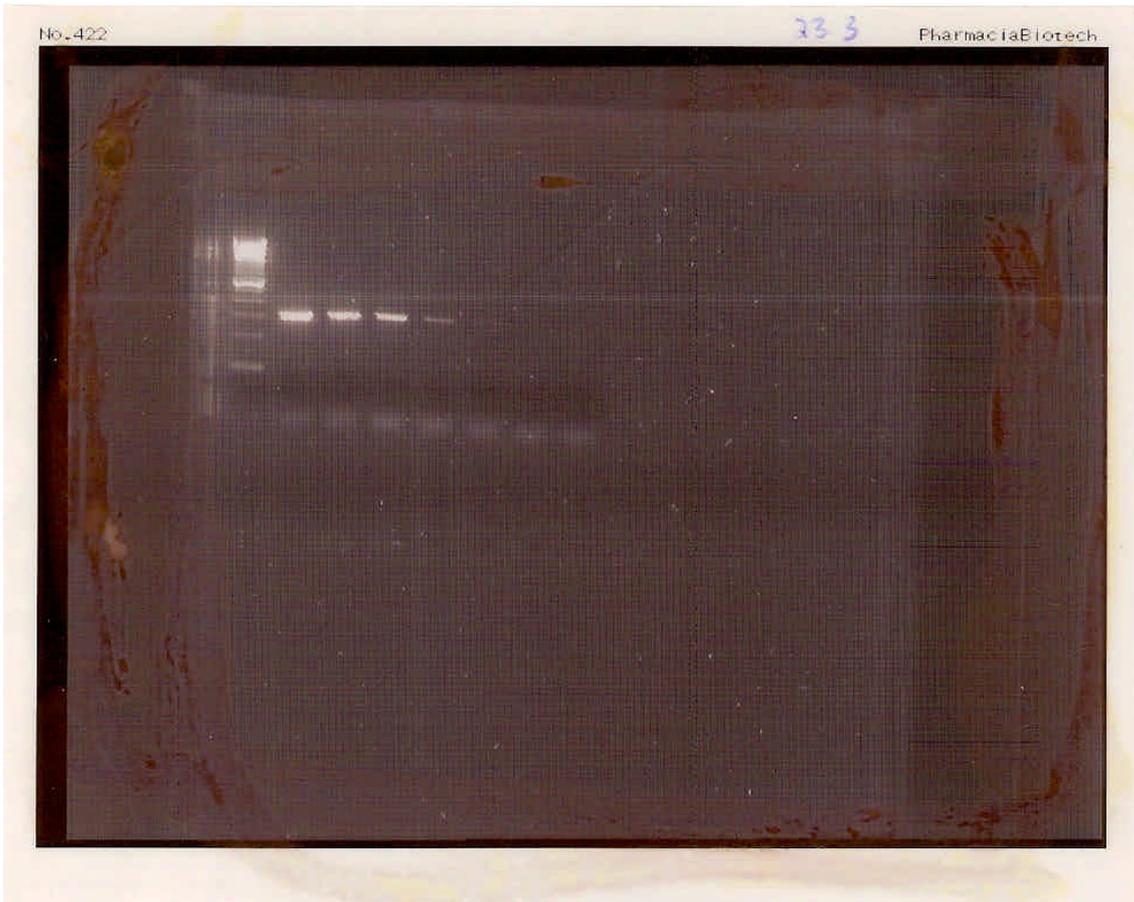
3.3.3 Sensitivitätsmessung mittels Verdünnungsreihe

Die Sensitivität dieser Methode wurde sichergestellt, indem eine Verdünnungsreihe von Aspergillus-DNA erstellt wurde. Diese enthielt 10^5 bis 10^1 Kopien der Aspergillus-DNA.

Einen Beweis hierfür liefert die unten aufgeführte Abbildung 2.

Zu sehen ist ein Gelelektrophoresefoto. Der Verlauf des Geles ist senkrecht von unten nach oben darauf abgebildet. Weiße, helle Bande markieren ein positives Resultat. Die linke Spalte zeigt den ladder, danach folgt die Verdünnungsreihe von 10^5 bis 10^1 Kopien der Aspergillus-DNA. Die H₂O-Negativprobe schließt sich daraufhin an und eine letzte Spalte stellt die Candida-DNA-Probe dar. Positives Ergebnis zeigt sich für 10^5 bis 10^1 Kopien der Aspergillus DNA (10^1 Kopien kaum sichtbar). Die mitgeführten Kontrollen verbleiben negativ.

Abbildung 1: Verdünnungsreihe von Aspergillus-DNA mit dem TS2-Primer



Bei jedem durchgeführten PCR-Lauf mit dem TS2-Primer wurde die mitgeführte Aspergillusprobe positiv getestet und als Bande im UV-Licht sichtbar.

3.3.4 Aspergilluspezifität

In jedem PCR-Lauf wurde eine Probe mit Candida-DNA mitgeführt. Diese ergab bei jeder Testung ein negatives Resultat mit dem TS2-Primer. Somit war die Aspergilluspezifität gegeben.

3.3.5 Positive Ergebnisse des PCR-Gels mit dem TS2-Primer in Bezug auf die Patienten

Tabelle 16: Patientenproben mit positivem Ergebnis

Patientennummer	Einteilung nach EORTC/NIAID	Grund-erkrankung	Anzahl der positiv getesteten Proben	Anti-mykotika	Prognose
168	Wahrscheinliche	ALL	3	ja	Exitus
436	Wahrscheinliche	AML	1	ja	Entlassung
434	Mögliche	CML	1	ja	Entlassung
444	Mögliche	AML	3	ja	Entlassung
536	Mögliche	CML	2	nein	Entlassung
314	Mögliche	MPS	2	ja	Entlassung
319	Mögliche	NZC	2	ja	Exitus

466	Mögliche	MPS	1	ja	Entlassung
524	Mögliche	AML	2	ja	Entlassung
528	Mögliche	AA	2	ja	Entlassung
530	Mögliche	CML	1	ja	Exitus
161	Mögliche	AML	2	nein	Entlassung
243	Mögliche	ALL	6	nein	Entlassung
163	Mögliche	CML	4	nein	Entlassung
171	Mögliche	CML	7	nein	Entlassung

Die 7 Proben des Patienten mit gesicherter Aspergillose ergaben ein negatives Resultat, aber 4 der 5 Proben der Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose resultierten positiv.

3.4 PCR-Gel mit dem AfLC2-Primer

3.4.1 Ergebnisermittlung mittels PCR und Gel mit dem AfLC2-Primer

Die Auswertung wurde, mit dem gleichen Verfahren wie für den TS2-Primer schon beschrieben vorgenommen.

3.4.2 Gesamtergebnis

100 der 100 Patientenproben ergaben ein negatives Resultat.

3.4.3 Sensitivitätsmessung für den AfLC2-Primer

Eine Verdünnungsreihe wurde mit 10^5 bis 10^1 Kopien von Aspergillus-DNA erstellt und getestet. Es wurde jedoch nur für 10^5 und 10^4 Kopien der Aspergillus-DNA ein positives Ergebnis erzielt.

Abbildung 2 stellt dieses Ergebnis nach Gelelektrophorese dar.

Abbildung 2: Verdünnungsreihe von Aspergillus-DNA mit dem AfLC2-Primer



Dieses Gelelektrophoresefoto zeigt positive Banden als weiße helle Fluoreszenzen. Der Lauf des Gels ist senkrecht von unten nach oben angeordnet. Die linke Spalte zeigt den ladder. Es folgt die Verdünnungsreihe

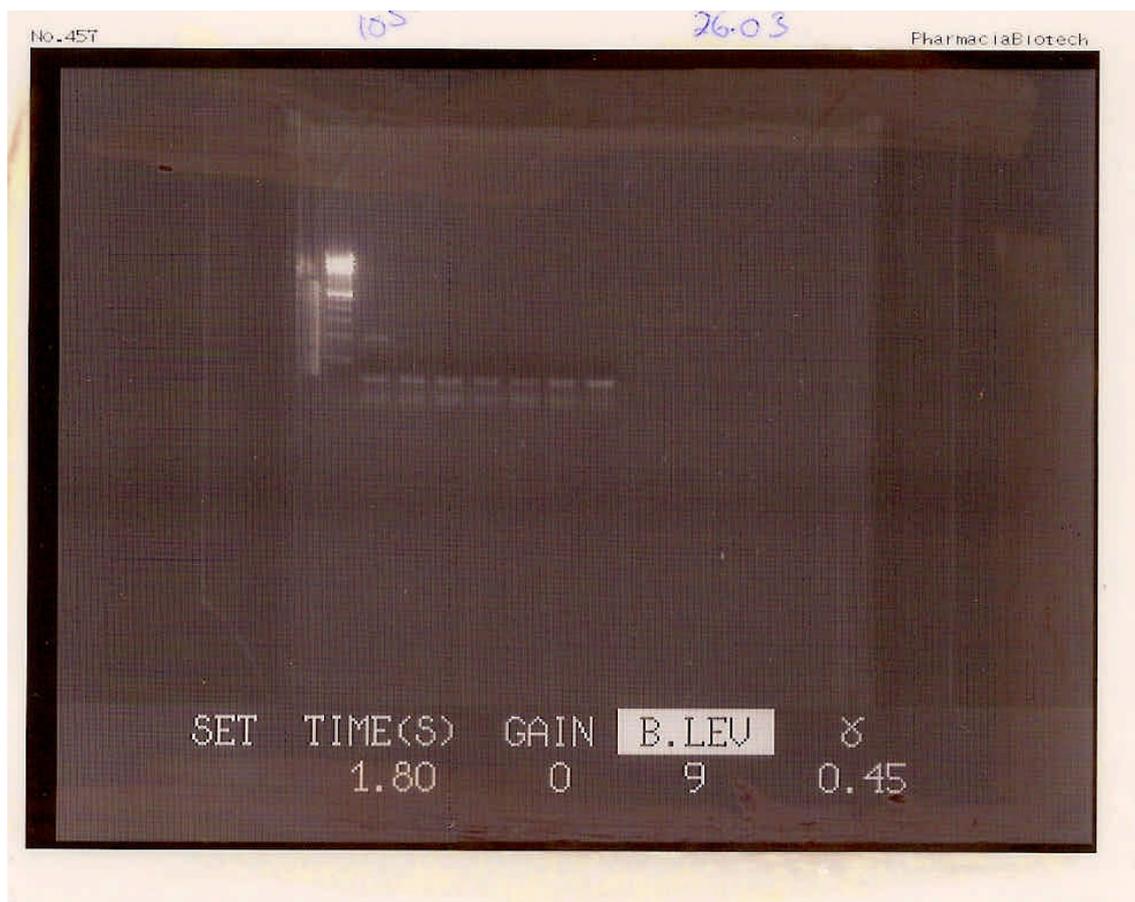
von 10^1 bis 10^5 Kopien von Aspergillus-DNA. Siebte Spalte stellt die H_2O -Kontrolle dar. Letzte Spalte zeigt den Lauf der Candida-DNA-Probe. Positives Resultat ergab sich nur für 10^5 und 10^4 Kopien der Aspergillus-DNA. Die Kontrollen blieben negativ.

3.4.4 Variation der Magnesiumkonzentration

Um eine Verbesserung der Sensitivität zu erreichen wurde die Konzentration des $MgCl_2$ von 3mM auf 13,5 mM erhöht. Das Ergebnis war, dass nur noch 10^5 Kopien von Aspergillus-DNA zu einem positiven Resultat führten.

Abbildung 3 veranschaulicht dieses Ergebnis.

Abbildung 3: Verdünnungsreihe mit $MgCl_2$ -Zusatz



Dieses Gelelektrophoresefoto zeigt den gleichen Versuchsaufbau wie oben bereits beschrieben. Die linke Spalte zeigt den ladder. Es folgt die Spalte mit 10^5 Kopien der Aspergillus-DNA. Danach schließen sich die abnehmenden

Konzentrationen an (10^4 bis 10^1) und die H₂O- und Candidakontrolle. Das Bild zeigt nur ein positives Ergebnis für 10^5 Kopien der Aspergillus-DNA.

3.4.5 Variation der Zyklenanzahl

Um eine höhere Anzahl der DNA-Kopien in den Proben zu erreichen wurde bei der AfLC2-PCR die Zyklenzahl auf 55 erhöht ohne Verbesserung der Resultate.

3.4.6 Aspergilluspezifität

Für die PCR mit dem AfLC2-Primer wurde ebenfalls die Aspergilluspezifität nachgewiesen. Bei jeder Testung wurde eine Probe mit Candida-DNA in einer Konzentration von 10^5 Kopien mitgeführt. Sie verblieb immer negativ.

3.5 Vergleich der drei PCR-Verfahren

3.5.1 Übereinstimmung der positiven Ergebnisse der Panfungal-PCR mit denen der TS2-Primer-PCR

Tabelle 17: Vergleich der Übereinstimmungen

Positivproben	Panfugalprimer	TS2-Primer	Übereinstimmung
Patient			
168	2	3	2 (66%)
436	1	1	1(100%)
444	1	3	1
536	1	2	1
314	2	1	1(50%)
319	2	2	2(100%)

528	1	2	1(100%)
161	1	2	1(100%)
243	3	6	2
163	7	4	3
171	4	7	4
Summe			19

D.h. keine Übereinstimmung bei dem Patienten mit gesicherter Aspergillose (0 von 7 Proben), aber 75% bei den Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose (3 von 4 Proben).

3.5.2 Übereinstimmung der Negativproben

42 der 100 Proben ergaben ein negatives Ergebnis sowohl für die Panfungal- sowie für die TS2-PCR.

3.5.3 Gesamtübereinstimmung

Für insgesamt 61 Proben konnte ein konkordantes Ergebnis im Vergleich der Panfungal- mit der TS2-PCR erzielt werden.

3.5.4 Gesamtergebnis des Vergleichs

TS2-Primer und AfLC2-Primer sind aspergilluspezifisch. Der TS2-Primer erzielt im Vergleich eine bessere Sensitivität.

Sowohl für den Panfungal-Primer als auch für den TS2-Primer ergaben 39% der Proben ein positives Ergebnis.

Der Panfungal-Primer testete die 7 Proben des Patienten mit gesicherter Aspergillose wieder positiv, während der TS2-Primer hier versagte.

Jedoch konnte der TS2-Primer 4 der 6 Proben der Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose ein positives Resultat geben, der Panfungal-Primer nur 3.

Während der AMBISOME-Studie waren alle 100 Proben mit dem Panfungal-Primer unter Anwendung derselben Methodik positiv auf Aspergillus-DNA getestet worden, dies konnte nur für 2/5 der Proben reproduziert werden.

Der AfLC2-Primer ergab für alle 100 Proben ein negatives Resultat und ist somit den TS2- und Panfungal-Primer unterlegen.

4 Diskussion

4.1 *Stand der Forschung*

Die Diagnose und Therapie einer invasiven Aspergillose ist bislang noch mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Es existieren keine eindeutige und sichere Verfahren für die Erkennung einer Infektion. Eine Therapie wird oft spät begonnen und birgt vielerlei Komplikationen durch Nebenwirkungen, Vorbehandlung und Grundkrankheit des Patienten. Breiter Antibiotikaeinsatz hat bakterielle Infektionen zu Gunsten der Pilzinfektionen entstehen lassen. Zusätzlich führen einerseits neue Formen der Chemo- und Radiotherapie, die zudem länger dauernde Neutropeniephasen verursachen, und andererseits die Ausweitung der immunsuppressiven Therapie auf andere Krankheitsbilder sowie immer häufiger vorgenommene Transplantationen zu einer rasant steigenden Inzidenz der IA und der damit verbundenen hohen Mortalitätsrate bei diesen Patienten. (Segal et al.,2006; Hebart et al.,2004; Stevens,2002; Loeffler et al.,2001; Van Burik et al.,1998b)

Aus diesem Grund macht die Forschung kontinuierlich Fortschritte auf dem Gebiet der invasiven Aspergillose. Es kommt stetig zu neuen Entwicklungen in der Diagnosemöglichkeit, Verfahrenstechnik und pharmazeutischen Behandlungsstrategien einer IA. So liefert vor allem die molekularbiologische Diagnostik vielversprechende Ergebnisse und ist Gegenstand zahlreicher Forschungsstudien. DNA gewinnt als Untersuchungsmaterial zunehmend an Bedeutung. So werden nicht nur Techniken des Antigen- und Antikörpernachweises stetig verfeinert, sondern auch komplexe Zusammenhänge beispielsweise auf molekularbiologischer Rezeptorebene verstanden und die Forschung auf diesem Gebiet ausgeweitet. Ebenso sind immunologische Nachweismethoden wesentlicher Forschungsbestandteil. (Luther et al.,2006)

Ein zentrales Thema in der wissenschaftlichen Diskussion angesichts invasiver Aspergillosen stellt die medikamentöse Prophylaxe dar. Da eine

medikamentöse Prophylaxe vielen Patienten nicht zugemutet werden kann und darüber hinaus teuer und wenig effektiv erscheint, wird diese meist nicht durchgeführt. Es bleibt zu prüfen, ob neue präventive Strategien mit unterschiedlichen Arzneimitteln eine künftige Prophylaxe in der Klinik möglich machen. Eine Verbesserung des Wirkspektrums oder die Reduzierung der Nebenwirkungen lassen hoffen, ob z.B. Triazole oder Echinocandine für eine effektive primäre oder sekundäre Prophylaxe einsetzbar sind. Es ist trotz gewonnener Erkenntnisse im Krankheitsbild der IA noch unklar, welche Patientengruppen von einer solchen medikamentösen Prophylaxe profitieren werden. Deswegen wird großes Augenmerk auf die Früherkennung von invasiven Aspergillosen gerichtet, da der entscheidende Überlebensfaktor einer IA die möglichst frühe Diagnosestellung ist. Für diese sind bisher nur der direkte und kulturelle Nachweis aus sterilen Untersuchungsmaterialien als sichere Infektionszeichen einer IA in den Richtlinien der EORTC aufgenommen worden. (Chamilos et al.,2006; Munoz et al.,2006; Mourissey et al.,2006; Mantadakis et al.,2006)

Durch die Einführung der Candidaprophylaxe mit Fluconazol sind es in der Klinik die Infektionen mit Aspergillen, die aktuell größte Bedeutung besitzen. Die Forschung befasst sich aus diesem Grund mit der Suche nach Möglichkeiten, Aspergillus spezifisch und sensitiv genug zu testen, um eine in der klinischen Routine verwendbare Methode zu entwickeln, die eine sichere Diagnose einer IA liefern kann. (Ullmann et al.,2006; Muller et al.,2002; Loeffler et al.,2002b; Baddley et al.,2001; Aisner et al.,1977; Skladney et al.,1999; Latge,1999)

Weitere entscheidende Fortschritte wurden in der bildgebenden Diagnostik erzielt. Auf diesem Gebiet wurde nicht nur die apparative Technik verbessert, sondern auch Studien durchgeführt, die nahelegen, dass ein computertomografisch gestütztes Screening an Hochrisikopatienten hilfreich sein kann, damit die richtige Diagnose gestellt werden kann. Die Bedeutung insbesondere der High Resolution Computertomografie nimmt immer weiter zu, vor allem zur schnellen Diagnosefindung, aber auch zur differentialdiagnostischen Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen. Ein

entscheidender Vorteil hierbei ist, dass sie überall verfügbar ist, nicht invasiv und in kürzester Zeit eine therapierelevante Diagnose liefern kann.

4.1.1 Diagnoseschwierigkeiten

Die Symptome, die ein Patient bei Erkrankung zeigt, sind oft unspezifisch und nicht eindeutig, sie lassen keinen klaren Schluss auf eine IA zu. Die Behandlung einer IA erfolgt in vielen Fällen auf Verdacht.

(Hummel et al.,2006; Ascioğlu et al.,2002; Denning,1998)

Ein sicherer Beweis einer Infektion mit Aspergillen liefert nur die Histologie und Kultur einer entnommenen Probe. Die Patienten sind jedoch oftmals so schwer erkrankt, dass eine Biopsie oder ein anderer invasiver Eingriff, dem Patienten nicht zugemutet werden kann. Die Zuverlässigkeit des Nachweises wird durch ubiquitäres Vorkommen der Aspergillen und Verunreinigung der Materialien eingeschränkt. (White et al., 2006; Sanguinetti et al.,2003)

Nichtinvasive Methoden, die sensitive und spezifische Ergebnisse liefern, um sie in der klinischen Routine einsetzen zu können, sind noch nicht sicher genug. Verfahren, die schnell und sicher zu einer eindeutigen Diagnose führen, gibt es bisher nicht. (Halliday et al.,2006; Segal et al.,2006; Raad et al.,2002; Skladny et al.,1999)

4.1.2 Aspergillusdetektion mittels PCR

Die PCR ist seit vielen Jahren eine bewährte und oft eingesetzte Methode in verschiedensten Gebieten der Forschung. Unterschiedliche Gensequenzen werden amplifiziert und mit einer geeigneten Methode detektiert. Durch eine große Auswahl von Primern können die unterschiedlichsten Gene analysiert werden. Da DNA leicht zu Verfügung steht ist es möglich aus vielerlei Probenmaterial diese für den Nachweis zu gewinnen. Auch für die Pilzdiagnostik wurden schon viele PCR-Verfahren entwickelt und für den klinischen Gebrauch etabliert. (Florent et al.,2006; El-Mahallawy et al.,2006)

Chen et al.,2002; Ferns et al.,2002; Loeffler et al.,2002a; Hebart et al.,2000b; Einsele et al.,1997)

Heutzutage gibt es konventionelle PCR-Techniken, die schon seit langem routinemäßig eingesetzt werden, aber auch neue PCR-Methoden, die in Echtzeit schnell Ergebnisse liefern. PCR-Verfahren können dabei qualitative Resultate erbringen, wie auch quantitative Aussagen über die Pilzlast erheben.

Für den Pilznachweis stehen eine Vielzahl von unterschiedlichen Primern zur Verfügung. Sie amplifizieren jeweils andere Genregionen. Diese Regionen können multy-copy-Gene sowie mitochondriale- und ribosomale DNA-Sequenzen sein. Die jeweiligen Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen Primer variieren stark. (Dean et al.,2006; Lau et al.,2006; Rantakokko-Jalava et al., 2003; Chen et al.,2002; Stevens,2002; Costa et al.,2001; Lass-Floerl et al.,2001; Loeffler et al.,1999)

Trotz der zahlreichen Vorteile, die die PCR-Technik bietet kann sie als klinischer Standard nicht festgesetzt werden. Zwar sind schon mehrere PCR-Verfahren klinisch etabliert, jedoch fehlt ihr die eindeutige Beweiskraft, um als sicheres Diagnosekriterium zu gelten. Hinsichtlich der Sensitivitäten und Spezifitäten herrscht Uneinigkeit. Ergebnisse und Aussagen, der bisher durchgeführten Studien variieren in hohem Maße. In den jeweiligen Labors werden oft hauseigene Techniken angewandt, die den Vergleich der verschiedenen Resultate kaum möglich macht. (El-Mahallawy et al., 2006; Bretagne et al.,2003; Sanguinetti et al.,2003 Cost et al.,2002; Loeffler et al.,1997; Einsele et al.,1997)

Zum Nachweis der Aspergillus-DNA nach der Amplifikation durch die PCR, haben sich verschiedene Detektionsverfahren bewährt. Unter anderem werden Gelelektrophorese, PCR-ELISA, southern blot, nested PCR- und auch Real-time-PCR-Methoden angewandt. Die Gelelektrophorese kann innerhalb von

zwei Stunden durchgeführt werden, während die PCR-ELISA zwei Tage in Anspruch nehmen kann. Jedoch kann durch Wahl der Antikörper-Sonden eine Differenzierung der Pilzspezies vorgenommen werden, die bei der Gelelektrophorese nicht möglich ist. Sehr positive Resultate erbringt eine, der etablierten ELISA-Methoden, hier wird das Genprodukt mit Dioxygenin markiert und mit Oligonucleotidsonden über Biotin an die Mikrotiterplatte gebunden. Das gebundene Substrat wird dann anhand von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Gute Ergebnisse konnte auch die nested PCR liefern, bei der sich hohe Sensitivitäten wie Spezifitäten feststellen ließen. Ebenfalls erbringt die Analyse mit southern blot eine gute Sensitivität und Spezifität, aber diese Methode ist durch ihren hohen Zeit- und Arbeitsaufwand mit einem Nachteil behaftet. (Lau et al.,2006; Mennink-Kersten et al.,2004; Pinel et al.,2003; Williamson et al,2000; Kawamura et al.,1999; Loeffler et al.,1998; Yamakami et al.,1996; Heid et al.,1996)

4.1.3 Vergleich der konventionellen PCR

Die konventionelle PCR ist zwar in Schnelligkeit und quantitativer Aussagekraft, den Real-time-PCR-Verfahren unterlegen, jedoch ist sie durch zahlreiche Studien und langjährigem Einsatz ein sehr elaboriertes und günstiges Verfahren in der Forschung. In vielen Kliniken kommt sie zum routinemäßigem Gebrauch. Nachteil aller PCR-Verfahren ist ihre hohe Rate an falsch positiven Ergebnissen. Diese sind auf die Anfälligkeit für Kontaminationen zurückzuführen. Um jedwellige Kontamination auszuschließen werden Vorsichtsmaßnahmen getroffen. Das Tragen von Handschuhen, Kitteln, Mundschutz und Arbeiten unter einem speziellem Abzug sind darunter einbegriffen. (Floernt et al.,2006; Pryce et al.,2003; Martino et al.,2002; Golbang et al.,1999; Loeffler et al.,1998)

4.1.4 Vergleich der AfLC2-, TS2- und Panfungal-Primer

Der Panfungal-Primer ist ein weit verbreiteter und in der Klinik häufig eingesetzter Primer in der Diagnostik von Pilzinfektionen. Er ist jedoch nicht aspergilluspezifisch und testet daher verschiedene Candida- und

Aspergillusarten positiv. Der Panfungal-Primer bindet an die 18S-rRNA Genregion. Diese ist ein hochkonserviertes multy-copy-gen. Durch diese Gegebenheit kommt es zu sehr guten Ergebnissen für Sensitivität und Spezifität.

Der TS2-Primer bindet an die ITS-Region (internally transcribed spacer), die ebenfalls als multy-copy-gen vorliegt. Diese Genregion liegt zwischen dem 18S und 28S Gen als ribosomale RNA vor, und ist für Aspergillus spezifisch.

Der AfLC2-Primer amplifiziert eine Sequenz aus dem mitochondrialen Cytochrom b Gen. Das Fragment ist 194bp lang und aspergilluspezifisch. Erste Ergebnisse brachten vielversprechende Aussagen. So lagen die Sensitivitäten der aspergilluspezifischen Primer zwischen 40 und 60%, wobei Proben von Patienten mit keinem Anhalt für eine invasive Aspergillose negativ verblieben. Eine umfassende Studie und einen etablierten Standard für diese Primer fehlen jedoch. Es ist wichtig in der Diagnostik zwischen Aspergillus- und Candidaspezien unterscheiden zu können, um Therapiemöglichkeiten gezielt einzusetzen. (Lau et al.,2006; Einsele et al.,1997; Golbang et al.,1999; Loeffler et al.,2001; Spiess et al.,2003)

4.1.5 Vergleich zu anderen Detektionsmethoden

Eine Reihe von Detektionsmethoden, wie die PCR für Aspergillus-DNA stehen in der Klinik zur Verfügung. Blutkultur, Antigen- und Antikörpernachweis kommen hierbei zur Anwendung.

Die Blutkultur hat den Nachteil, dass der Zeitaufwand groß ist und damit keine Frühdiagnostik, die für den Patienten wesentlich ist, möglich ist. Sie liefert des Weiteren selten positive Ergebnisse und im Vergleich zur PCR ist sie deutlich unterlegen. Die PCR zeichnet sich mit höheren Sensitivitäten aus. (Verdaquer et al.,2006; Loeffler et al.,2002a; Kami et al.,2001; Einsele et al.,1997)

Die Detektion mittels Antikörper ist prinzipiell möglich hat sich aber im klinischem Gebrauch nicht behaupten können. Das liegt daran, dass bei einem Großteil der Patienten, Immunsuppression oder Neutropenie vorherrschen und

deswegen der Nachweis von Antikörpern nicht erzielbar ist. (Golbang et al.,1999; Van Burik et al.,1998b)

Die höchste Sensitivitätsrate wird bei der Antigentestung erzielt. Der Galaktomannan-Nachweis durch ein ELISA-Test steht hier im Vordergrund. Einige Studien lieferten bessere Ergebnisse für diese Methode als eine PCR. Jedoch besteht auch bei der Galaktomannan-ELISA der Nachteil von einer hohen Rate falsch positiver Resultate. (Hope et al.,2006; Verdaguer et al.,2006; Kawazu et al.,2004; Pinel et al.,2003; Reiss et al.,2000; Maertens et al.,1999; Bretagne et al.,1998)

4.1.6 Vergleich von Probenmaterial

Prinzipiell eignen sich die unterschiedlichsten Probenmaterialien für den PCR-Nachweis von Aspergillus-DNA. Jedoch bieten einige von ihnen Vorteile gegenüber den anderen. Häufig untersuchte Proben sind Blut, bronchoalveoläre Lavage (BAL), Liquorflüssigkeit und Sputum.

Blutproben bieten den Vorteil, dass sie bei immunsupprimierten Patienten routinemäßig abgenommen werden und so keine zusätzliche Belastung der Patienten darstellen. Somit können sie als Screeningmethode dienen. Durch die Möglichkeit einer seriellen Untersuchung wird zum einen festgestellt, ob Aspergillus-DNA im Blut zu finden ist und zum anderen ein Monitoring über die Pilzlast geführt. Ein Nachteil liegt darin, dass mehr als eine Blutprobe analysiert werden muss um als aussagekräftig zu gelten, da die Pilz-DNA nicht kontinuierlich im Blut der Patienten zu finden ist. (White et al.,2006; Chen et al.,2002; Einsele et al.,1997; Yamakami et al.,1996)

In der vorliegenden Arbeit wurde Aspergillus-DNA ausschließlich aus Blutserumproben analysiert.

Da die Aspergillose am häufigsten in der Lunge auftritt, ist die Verwendung von Sputum und BAL-Proben in der Klinik oftmals indiziert. Der DNA-Nachweis ist möglich, jedoch besteht bei Sputumsekreten der Nachteil, dass sich nicht sicher differenzieren lässt, ob eine Kolonisation, eine wirkliche Infektion oder

womöglich eine Kontamination aus der Luft stattgefunden hat. Die BAL-Gewinnung bietet hier dagegen Vorteile, sie stellt aber einen invasiven Eingriff dar und kann bei vielen Patienten, aufgrund der Schwere der Erkrankung nicht angewendet werden. (Althoff Souza et al.,2006; Bissinger et al.,2005; Bretagne,2003; Rantakokko-Jalava et al.,2003; Loeffler et al.,2002b; Melchers et al.,1994; Van Belkum et al.,1993)

4.2 *Diskussion der Ergebnisse*

Ein wesentlicher Bestandteil wissenschaftlicher Arbeit ist es eine Methode in für den klinischen Alltag zu etablieren, die sich mit hoher Sensitivität, Spezifität wie auch Reproduzierbarkeit auszeichnet. V.a. in der Aspergillus-Diagnostik bei Risikopatienten ist es essentiell verbesserte Früherkennungsverfahren zu entwickeln, da die bisherigen Therapie- und Diagnosemöglichkeiten nicht ausreichen und die Mortalitätsrate hoch ist. (Munoz et al.,2006; Alexander,2002; Lin et al.,2001; Einsele et al.,2000)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher verschiedene Primer für den PCR-Nachweis von Aspergillen miteinander zu vergleichen, ihre Spezifität und Sensitivität zu testen und eine Aussage für den klinischen Gebrauch bei invasiven Aspergillosen zu treffen.

Die einzelnen Proben wurden aufgetaut und mit den verschiedenen Primer in der PCR analysiert. Sie waren alle zum Zeitpunkt der Blutabnahme, als Screeningmaßnahme, schon positiv mit der PCR-ELISA auf Aspergillus-DNA getestet worden.

Von insgesamt 25 Patienten hatte ein Patient die Diagnose einer gesicherten Aspergillose, 2 Patienten eine wahrscheinliche Aspergillose und 22 eine mögliche Aspergillose.

Der etablierte Panfungal-Primer mit der PCR-ELISA ergab die besten Resultate. Der AfLC2-Primer schnitt mit einem nicht zufriedenstellendem Ergebnis ab, obwohl Studien Anhalt für aussichtsreiche Resultate zeigten.

Vorteilhafte und positive Ergebnisse erbrachte die Testung mit dem TS2-Primer. (Loeffler et al.,2002a; Spiess et al.,2003)

4.2.1 Leistung der PCR-ELISA mit dem Panfungal-Primer

Dieses PCR-ELISA-Verfahren ist eine schon in zahlreichen Studien etablierte und in der Klinik angewandte Methode für die Aspergillus-Diagnostik. In der Literatur belegen die Ergebnisse dieses Nachweises gute Sensitivitäten und Spezifitäten und auch ihre Reproduzierbarkeit ist gegeben, so dass dieses Verfahren routinemäßig eingesetzt wird. Jedoch wird in Studien auch über eine Anfälligkeit für falsch positive Ergebnisse berichtet. (El-Mahallawy et al.,2006; Lass-Floerl et al.,2001; Golbang et al.,1999; Van Burik et al.,1998; Loeffler et al.,1998)

Auch bei der vorliegenden Arbeit konnten solche Sensitivitäten und Spezifitäten wiedergegeben werden. Von 100 Proben wurden 39 positiv auf Aspergillus getestet. Darunter war jede der 7 von 7 Proben des Patienten mit gesicherter Aspergillose positiv für Aspergillus-DNA und 3 der 6 Proben von den Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose. D.h. diese Methode liefert ein sehr günstiges Ergebnis für die klinische Diagnostik. Es ist möglich, dass die Patienten mit möglicher Aspergillose und wiederholt positivem Ergebnis sehr wohl mit Aspergillus infiziert waren, aber keine Symptome zeigten oder ein falsch positives Ergebnis vorliegt. Das kann aufgrund von Kontaminationen vorkommen. (Bretagne,2003; Loeffler et al.,1997)

Da nur 2/5 der Proben ein wiederholt positives Ergebnis zeigten, obwohl die identische Methode angewandt wurde, lässt vermuten, dass beim Einfrieren von DNA Information verloren geht. Dies ist aber nicht vollständig geklärt.

Insgesamt ist die PCR-ELISA eine etablierte Methode, die durch viele Studien belegt worden ist, in der Klinik einfach anwendbar ist, aber Pilz-DNA unspezifisch testet. Daher sind in der ELISA verschiedene Antikörper zur Differenzierung nötig.

4.2.2 Leistung des PCR-Gel-Verfahren mit dem TS2-Primer

In verschiedenen Studienprotokollen stellte sich der TS2-Primer als vielversprechend heraus. Gerade seine Spezifität für *Aspergillus* macht bei der Diagnostik einen wesentlichen Vorteil aus. Die PCR-Methode, die in dieser Analyse Anwendung findet ist etabliert und in zahlreichen Studien als Standard festgesetzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Spezifität des TS2-Primer für *Aspergillus* in jeder Testreihe wiedergegeben. Candidaprobe blieben zu jedem Zeitpunkt negativ. Die Sensitivität lag bei 39%, von den insgesamt 100 Proben und ist damit dem Panfungal-Primer gleich. Ein Standard von 10^5 bis 10^1 Kopien *Aspergillus*-DNA konnte für den TS2-Primer etabliert werden, und damit ausreichende Mengen von *Aspergillus*-DNA getestet werden. Jedoch verblieben die 7 von 7 Proben des Patienten mit sicherer Aspergillose negativ, was die Anwendung in der Klinik fraglich erscheinen lässt. Vielleicht trägt die Tatsache, dass die Proben eingefroren waren dazu bei, negative Resultate zu liefern. Die geringe Probenanzahl lässt in dieser Hinsicht keinen genauen Schluss zu. Vier Proben der insgesamt sechs bei den Patienten mit wahrscheinlicher Aspergillose wurden als positiv erkannt, und damit geringfügig besser als bei der Panfungal-Testung.

Insgesamt ist die TS2-PCR eine aussichtreiche Methode, Spezifität für *Aspergillus* und eine Standardreihe konnte erreicht werden. Für die Reliabilität in der Klinik sollte eine umfangreiche Studie mit einer größeren Anzahl von Patienten mit gesicherter und wahrscheinlicher Aspergillose Aussage geben können über die Anwendbarkeit in der Klinik. (Hummel et al.,2006; Lau et al.,2006; Spiess et al.,2003)

4.2.3 Leistung des PCR-Gel-Verfahren mit dem AfLC2-Primer

Studien über den AfLC2-Primer haben erfolgsversprechende Ergebnisse geliefert und wurde schon mit unterschiedlichsten PCR-Verfahren getestet und

etabliert. V.a. wurde dieser mittels real-time-PCR getestet (Spiess et al.,2003; Buchheidt et al.,2004; White et al.,2006)

Auch der AfLC2-Primer ist aspergillisspezifisch, das auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Nur Aspergillus-Proben ergaben ein positives Ergebnis, Candidareihen verblieben stets negativ. Jedoch konnte eine Standardreihe von 10^5 bis 10^1 Kopien an Aspergillus-DNA nicht wiedergegeben werden. Hier konnte ergaben nur Proben für 10^5 und 10^4 Kopien ein positives Resultat. Dadurch lässt sich womöglich erklären, dass alle 100 von 100 getesteten Proben negativ für Aspergillus-DNA verblieben. Es ist ebenso möglich, dass dieses Verfahren anfälliger auf die Einfrierung von Proben reagiert. Enttäuschen ist dieses Ergebnis in der Hinsicht, dass Studien schon gute Ergebnisse geliefert haben. Dies kann daher zurückzuführen sein, dass in diesen Studien ausschließlich Patienten mit gesicherter und wahrscheinlicher Aspergillose getestet wurden. (Spiess et al.,2003; Munoz et al.,2006)

4.3 Schlussfolgerung

Die Diagnose von invasiven Aspergillosen stellt für den in der Klinik tätigen Arzt aufgrund der Diagnoseschwierigkeiten eine besondere Herausforderung dar. Dieser muss sich auf seine Erfahrungen stützen und bei entsprechendem Verdacht differentialdiagnostisch auch eine IA in Erwägung ziehen. Jedoch kann keine der aktuellen Diagnosemöglichkeiten für sich allein eine sichere Aussage über invasive Aspergillosen bei immundefizienten Patienten treffen. Die Zusammenschau der verschiedenen Befunde ergeben schließlich die Diagnose einer IA. Hierbei spielen unterschiedliche Methoden eine herausragende Rolle.

Die PCR-Methode hat hohen Stellenwert in der Frühdiagnostik von Aspergilloseerkrankungen, da sie einfach und effizient durchzuführen ist und ebenso als Screening-Verfahren bei Risikopatienten angewendet werden kann. Die Analyse dieser Studie hat gezeigt, dass der Panfungal-Primer den anderen Primern durch seine vorzüglichen Ergebnisse überlegen ist. In einer Vielzahl von Studien zeigte er hohe Sensitivitäts- und Spezifitätsraten, so auch in der

vorliegenden Arbeit. Somit bietet er für den Gebrauch in der Klinik den entscheidenden Vorteil und darüber hinaus liefert er einen zuverlässigen Nachweis für Patienten mit sicherer und wahrscheinlicher Aspergillose. Ein Nachteil bleibt sein Unvermögen, Pilzarten voneinander zu unterscheiden. Der aspergilluspezifische Primer TS2 lieferte sowohl in vergangenen als auch in dieser Arbeit aussichtsreiche Ergebnisse. Seine Sensitivitätsrate ist mit der der Panfungal-Testung vergleichbar. Nur weist der TS2-Primer den Nachteil auf, dass - wie in der vorliegenden Arbeit bestätigt - ein Patient mit gesicherter Aspergillose nicht erkannt wird. Der aspergilluspezifische AfLC2-Primer scheint Literaturangaben nach vielversprechend zu sein. Dies konnte jedoch in dieser Studie nicht bestätigt werden. Die eindeutige Beurteilbarkeit von AI-Infektionen anhand dieser Primer ist in der vorliegenden Arbeit aber aufgrund der kleinen Patientenzahl und der lange dauernden Einfrierung der Proben eingeschränkt. Nur wenige Patienten mit gesicherter und wahrscheinlicher Aspergillose standen für diese wissenschaftliche Untersuchung zur Verfügung.

Es ist künftigen Studien vorbehalten, den Einsatz der TS2-Primer und AfLC2-Primer für den alltäglichen Gebrauch in der Klinik zu standardisieren. Dies sollte mit dem Einbeziehen größerer Patientenkollektive und frisch abgenommenen Blutproben erfolgen.

5 Zusammenfassung

In der Klinik spielen invasive Aspergillosen eine zunehmend bedeutende Rolle. Die Anzahl immundefizienter Patienten und die Häufigkeit von Transplantationen steigen rasant an. Diagnose- und Therapieoptionen sind mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden und zudem unzureichend, so dass die Mortalitätsrate bei Risikopatienten extrem hoch ist. Die Forschung ist daher bemüht, eindeutig wirksamere und leicht anwendbare Diagnosemethoden für den routinemäßigen Gebrauch in der Klinik zu entwickeln. In zahlreichen Studien zeigt sich die PCR-Diagnostik von Aspergillen als vielversprechend und vorteilhaft. Sie ist bei jedem Patienten anwendbar, leicht durchzuführen und erzielt relativ sichere Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Primer-Paare für die spezifische *Aspergillus fumigatus* Diagnostik bei Risikopatienten mit dem Panfungal-Primer verglichen. Ziel war es, Sensitivität und Spezifität zu testen, die Methode in der Klinik zu etablieren und ihre Anwendbarkeit zu überprüfen. Extrahierte DNA aus Blutproben, die durch eine andere Studie positiv getestet und eingefroren waren, wurden in dieser Arbeit angewandt.

Der Panfungal-Primer war überlegen. Er testete die Patienten mit sicherer und wahrscheinlicher Aspergillose eindeutig positiv. 61 Prozent der Proben blieben jedoch negativ, obwohl die selbe PCR wiederholt wurde. Der aspergilluspezifische Primer TS2 ergab gleiche Sensitivität, jedoch blieben die Proben für den Patienten mit sicherer Aspergillose negativ. Der AfLC2-Primer testete alle Proben negativ, seine Sensitivität in einer Verdünnungsreihe war gering.

Obwohl Studien zeigten, dass die PCR mit aspergilluspezifischen Primer aussichtsreiche Ergebnisse liefern, konnte dies in dieser Studie nicht bestätigt werden. Gründe können zum einen die länger dauernde Einfrierung der Proben und zum anderen die geringe Anzahl von Patienten mit sicherer und wahrscheinlicher Aspergillose sein. Es bleibt eine Herausforderung zukünftiger

Forschung, den Beweis für die Etablierung dieser Methoden im klinischen Alltag zu liefern und weiterhin auf dem Gebiet der Diagnostik und Therapie entscheidende Entwicklungen zu erzielen.

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	Desoxyribonucleic 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 glassa 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

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)Althoff Souza C, Muller NL, Marichiori E, Escuissato DL, Franquet T. (2006)

Pulmonary invasive aspergillosis and candidiasis in immunocompromised patients: a comparative study of the high resolutions CT findings

J Thorac Imaging 21, 184-9

4)Asciouglu, 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

5)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

6)Baden, L.R., Katz, J.T., Fishman, J.A., Koziol, C., DelVecchio, 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

7)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

8)Bennett, J.E., Powers, J., Walsh, T., Viscoli, C., De Pau, 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

9)Bhatti Z, Shaukat A, Almyroudis NG, Segal BH. (2006)

Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients.

Mycopathologia 162, 1-15

10)Bissinger AL, Einsele H, Hamprecht K, Schumacher U, Kandolf R, Loeffler J, Aepinus C, Bock T, Jahn G, Hebart H. (2005)

Infectious pulmonary complications after stem cell transplantation or chemotherapy: diagnostic yield of bronchoalveolar lavage.

Diagn Microbiol Infect Dis. 52, 275-80

11)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

12)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

13)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

14)Brown MJ, Worthy SA, Flint JD, Muller NL. (1998)

Invasive aspergillosis in the immunocompromised host: utility of computed tomography and bronchoalveolar lavage.

Clin Radiol. 53, 255-7

15)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 LightCyclerTM-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

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

Cutaneous Aspergillosis.
J. Clin. Microbiol. 36, 3115-3121

17)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

18)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

19)Chamilos G, Kontoyiannis DP. (2006)
Defining the diagnosis of invasive aspergillosis.
Med Mycol. 44, 163-72

20)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

21)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

22)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 Galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis.
J. Clin. Microbiol. 40, 2224-2227

23)Dean TR, Kohan M, Betancourt D, Menetrez MY. (2006)
A simple polymerase chain reaction-sequencing analysis capable of identifying multiple medically relevant filamentous fungal species
Mycopathologia 162, 265-71

24)Denning, D.W. (1998)
Invasive aspergillosis.
Clin. Infect. Dis. 26, 781-805

25)Dismukes, W.E. (2000)
Introduction to antifungal drugs.
Clin. Infect. Dis. 30, 653-7

26)Duthie, R., Denning, D.W. (1995)

Aspergillus fungemia: report of two cases and review.
Clin. Infect. Dis. 20, 598-605

27)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

28)Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Loeffler, J., Rotenhoefer, 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

29)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.

30)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

31)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 Oncology (DGHO).
Ann. Hematol. 82, 175-85

32)El-Mahallaway HA, Shaker HH, Ali Helmy H, Mostafa T, Razak Abo-Sedah A. (2006)

Evaluation of pan-fungal PCR assay and Aspergillus antigen detection in the diagnosis of invasive fungal infections in high risk paediatric cancer patients.
Med Mycol. 44, 733-9

33)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

34)Florent M, Katsahian S, Vekhoff A, Levy V, Rio B, Marie JP, Bouvet A, Cornet M. (2006)

Prospective evaluation of a polymerase chain reaction-ELISA targeted to Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus for the early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies.

J Infect Dis. 193, 741-7

35)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

36)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

37)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

38)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

39)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

40)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

41)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

42)Halliday C, Hoile R, Sorrell T, James G, Yadav S, Shaw P, Bleakley M, Bradstock K, Chen S. (2006)

Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia

Br J Haematol. 132 478-86

43)Hawkins, C., Armstrong, D. (1984)

Fungal infections in the immunocompromised host.

Cli. Haematol. 13, 599-630

44)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

45)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

46)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

47)Hebart, H., Einsele, H. (2004)

Specific infectious complications after stem cell transplantation.

Support. Care Cancer. 12, 80-5

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

Real time quantitative PCR.

Genome. Res. 6, 986-94

49) Hope, WW., Kruhlak, MJ., Lyman, CA., Petraitiene, R., Petraitis, V., Francesconi, A., Kasai, M., Mickiene, D., Sein, T., Peter, J., Kelaher, AM., Huges JE, Cotton MP, Cotten CJ, Bacher J, Tripathi S, Bermudez L, Mangel TK, Zervas PM, Wingard JR, Drusano GL, Walsh WJ (2006)

Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the Kinetics of Galactomannan in an In Vitro Model of Early Invasive Pulmonary Aspergillosis: Implications for Antifungal Therapy

J Infect Dis. 195 455-66

50) Hummel, M., Spiess, B., Kentouche, K., Niggemann, S., Bohm, C., Reuter, S., Kiehl, M., Morz, H., Hehlmann, R., Buchheidt, D. (2006)

Detection of *Aspergillus* DNA in cerebrospinal fluid from patients with cerebral aspergillosis by a nested PCR assay

J Clin Microbiol. 44 3989-93

51) 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

52) 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

53) 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

54) 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

55) 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 Galactomannan, 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

56) Keating, G.M., Jarvis, B. (2001)

Caspofungin

Drugs. 61, 1121-9

57)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

58)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

59)Latge, J.P. (1999)

Aspergillus fumigatus and Aspergillosis.
Clin. Microbiol. Rev. 12, 310-350

60)Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, Halliday C. (2006)

Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens
J Clin Microbiol. 2006

61)Lin, S.J., Schranz, J., Teutsch, S.M. (2001)

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

62)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

63)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

64)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

65)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

66)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

67)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

68)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

69)Luther, K., Ebel, F. (2006)

Toll-like receptors: Recent advances, open questions and implications for aspergillosis control.

Med. Mycol. 44, 219-27

70)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 galacto-mannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis.

J. Clin. Microbiol. 37, 3223-8

71)Mantadakis E, Samonis G. (2006)

Novel preventative strategies against invasive aspergillosis

Med Mycol. 44, 327-32

72)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

73)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

74)Martino, R., Subira, M. (2002)

Invasive fungal infections in haematology: new trends.

Ann. Hemato. 81, 233-243

75)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

76)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

77)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

78)Morrissey CO, Slavin MA. (2006)
Antifungal strategies for managing invasive aspergillosis: The prospects for an pre-emptive treatment strategy
Med Mycol. 44, 333-48

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

80)Munoz P, Guinea J, Bouza E. (2006)
Update on invasive aspergillosis: clinical and diagnostic aspects.
Clin Microbiol Infect. 12, 24-39

81)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

82)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

83)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

84)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

85)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

86)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

87)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

88)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

89)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

90)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

91)Ruhnke, M. (2000)

Antimykotische Therapie.

In: Marre, R., Mertens, T., Trautmann, M., Vanek, E.: Klinische Infektiologie. 134-47

Urban&Fischer Verlag, München, Jena.

92)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.

93)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

94)Schlegel, P.G. (2001)

Stammzelltherapie.

In: Speer, C.P., Gahr, M.: Pädiatrie, 730-739

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

95)Segal BH, Walsh TJ. (2006)

Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis

Am J Respir Crit Care Med. 173, 707-17

96)Simitsopoulou, M., Roilides, E., Likartsis, C., Ioannidis, J., Orfanou, A., Palioganni, F., Walsh, TJ. (2006)

Expression of immunomodulatory genes in human monocytes induced by voriconazole in the presence of *Aspergillus fumigatus*.

Antimicrob Agents Chemother.2006

97)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

98)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

99)Soubani, A.O., Qureshi, M.A. (2002)

Invasive pulmonary aspergillosis following bone marrow transplantation: risk factors and diagnostic aspect.

Haematologia (Budap). 32, 427-37

100)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

101)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.

102)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

103)Stevens, D.A. (2002)

Diagnosis of fungal infections: current status.

J. Antimicrobial chemotherapy 49, 11-19

104)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

105)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

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

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results.

Arch. Intern. Med. 162, 1558-66

107)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

108)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.

109)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

110)Ullmann AJ, Cornely OA. (2006)

Antifungal prophylaxis for invasive mycoses in high risk patients
Curr Opin Infect Dis. 19, 571-6

111)Verdaguer V, Walsh TJ, Hope W, Cortez KJ. (2007)

Galactomannan antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis
Expert Rev Mol Diagn. 7, 21-32

112)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

113)Wheat, L.J. (2003)

Rapid dignosis of invasive aspergillosis by antigen detection.
Transpl. Infect. Dis. 5, 158-66

114)White PL, Linton CJ, Perry MD, Johanson EM, Barnes RA. (2006)

**The evalution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction
assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in
a routine clinical setting.**
Clin Infect Dis. 42, 479-86

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

Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies.
Pharmacotherapy 23, 1592-610

116)Williamson, E.C., Leeming, J.P. (1999)

Molecular approaches for the diagnosis and epidemiological investigation of
Aspergillus infection.
Mycoses. 2, 7-10

**117)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

118)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

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, den hilfreichen Anregungen und die intensive Betreuung während der Durchführung der Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. Jürgen Löffler möchte ich besonders danken für die grenzenlose Motivation, seine geduldige und unendliche Hilfsbereitschaft, die zum Verständnis dieser Arbeit beigetragen haben.

Einen herzlichen Dank an Frau Ingrid Kumbier und Frau Marija Markulin, die während der Laborarbeit eine große Unterstützung waren.

Herzlich danken möchte ich meiner Familie, die immer Vertrauen in mich gesetzt und mich mit ihren Ratschlägen und ihrer Fröhlichkeit immerfort begleitet haben.

Meinen Freunden gilt Dank für das Geschenk zahlloser Ideen und liebevoller Ermutigung.

Meinen Professoren, Kollegen und Kommilitonen, besonders Prof. Dr. Abner Lozano Losada, danke ich für ihren Dienst an die Menschlichkeit.

Allen Patienten meine aufrichtige Dankbarkeit.

Der größten Inspirationsquelle und Kraftschöpfung danke ich vor allem Gott.

Lebenslauf

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name : Sandra Elena

Nachname : Fischer

Geburtsdatum : 28. Juni 1980

Geburtsort : Böblingen

Schulbildung

1986 - 1990 Ludwig-Uhland-Grundschule
Gärtringen

1990 - 1993 Theodor-Heuss-Realschule
Gärtringen

1993 - 1999 Schickhardt-Gymnasium
Herrenberg

06/1999 Allgemeine Hochschulreife, Abitur

Universitätsausbildung

10/1999 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

Famulaturen:

4/2001 Kinderchirurgie, Wien, Österreich

9/2002 Unfallchirurgie, Cali, Kolumbien

3/2003 Innere Medizin, Tübingen

9/2003 Gynäkologie, Miami, USA

2001 Ärztliche Vorprüfung

2002 1. Staatsexamen

2004 2. Staatsexamen

2004 - 2005 Praktisches Jahr
1.Tertial : Chirurgie, Neiva-Kolumbien
2.Tertial : Innere Medizin, Elche-Spanien; London-
England
3.Tertial : Gynäkologie, Stuttgarter Robert-Bosch-
Krankenhaus
11/11/2005 3. Staatsexamen und Approbation als Ärztin

Berufserfahrung

Seit 03/2006 Assistenzärztin Innere Medizin
Stuttgart

Forschung

2003 bis 2007 Promotionsarbeit an der Universität Tübingen,
Professor Einsele, Abteilung Hämatologie/Onkologie:
"Vergleich von PCR-Verfahren für die Aspergillus
fumigatus Diagnostik bei Risikopatienten"

Sprachen Spanisch, Englisch, Französisch, Latein

Hobbys Schwimmen, Reisen, Literatur