Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie, Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

Vergleich verschiedener Methoden zur Amplifikation und Detektion von Aspergillus-DNA im Blut von Patienten mit empirischer AmBisome-Therapie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sofia Paschalinou
aus Komotini
2007

Dekan : Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtserstatter : Professor Dr. H. Einsele

2. Berichtserstatter : Frau Privatdozentin Dr. U. Schumacher

gewidmet meinen Eltern
und meiner Schwester Eleni

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen…… 6

1. Einleitung…….. 8
    1.1 Taxonomie und Morphologie…… 9
        1.1.1 Mikroskopische Merkmale der Aspergillus-Spezies……. 9
        1.1.2 Makroskopische Merkmale der Aspergillus-Spezies……10
    1.2 Epidemiologie……..11
    1.3 Pathogenese……... 12
    1.4 Klinik…… 13
    1.5 Diagnostik…… 15
    1.6 Candida albicans…… 18
    1.7 Therapie……...21
    1.8 Prävention……22
    1.9 Fragestellung und Zielsetzung..…… 23

2. Patienten, Material und Methoden…….. 24
    2.1 Patienten…… 24
    2.2 Materialien…….. 24
        2.2.1 Untersuchungsmaterial..…… 24
        2.2.2 Geräte……..26
        2.2.3 Verbrauchsgegenstände…….. 25
    2.3 Methoden……26
        2.3.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut…….. 26
        2.3.2 Polymerase Kettenreaktion, PCR……... 28
        2.3.3 PCR-ELISA……30
        2.3.4 Light-Cycler……32
        2.3.5 DNA Detection Test Strips……... 35

3. Ergebnisse……... 38
3.1 PCR-ELISA…… 38
3.2 Light-Cycler…… 59
3.3 DNA Detection Test Strips…… 60

4. Diskussion…… 61
4.1 PCR…….. 61
4.1.1 PCR im Blut…… 62
4.1.2 Amplifikation einer bestimmten Genregion…… 63
4.1.3 Rolle der PCR in der Diagnostik…… 63
4.1.4 Therapieeinsatz und –überwachung durch die PCR…... 64
4.2 Aspergillus-Diagnostik……... 65
4.2.1 Radiologie……... 65
4.2.2 Labordiagnostik…… 66
4.3 Das Light-Cycler-System…….. 68

5. Zusammenfassung…… 69

6. Literaturverzeichnis……72

Tabellenverzeichnis…… 80

Abbildungsverzeichnis…… 82

Danksagung…… 83

Lebenslauf…….. 84

Verzeichnis der Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge.

A.	Aspergillus
Abb.	Abbildung
ABTS	Trademark von Roche Molecular Biochemicals
AE	Elution Buffer
AFUMSPEZ	Primer spezifisch für Aspergillus fumigatus
AL	Lysis Buffer
ATL	Tissue Lysis Buffer
AW	Wash Buffer
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
C.	Candida
CFU	Colony Forming Units
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
d`NTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
fg	Femptogramm
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GM	Galactomannan
GvHD	Graft-vs-Host-Disease
HCl	Hydroxychlorid
HEPA	High-Efficiency Particulate Air
H_2O	Wasser
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KMT	Knochenmarktransplantation
LC	Light Cycler
LED	Lichtemittierende Diode
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter

mM	Millimolar
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
PBPCT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
SCT	Stammzelltransplantation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Taq	Thermophilus aquaticus
Tris	Trishydroxymethylethylendiamin
U/min	Umdrehungen pro Minute
WCLB	White Cell Lysis Buffer

1. Einleitung

Schimmelpilze der Gattung Aspergillus sind in der Natur ubiquitär verbreitet [1]. Sie sind vor allem in kompostierter Erde zu finden, aber auch in Wassersystemen von Krankenhäusern [2].

Sie können unterschiedliche Krankheitsbilder auslösen. Die Exposition gegenüber Aspergillus kann oberflächliche Infektionen, Infektionen der inneren Organe und eine Reihe allergisch bedingter Erkrankungen verursachen [1,3 4].

Die erste bei Menschen beobachtete Infektion mit Aspergillus, ein Aspergillom, wurde im Jahre 1842 in Edinburgh dokumentiert. Allergische Infektionen wurden zum ersten Mal 1952 in London registriert und die erste invasive Form der Aspergillose als opportunistische Infektion ist 1953 bei einem Patienten aus Gloucester im British Medical Journal beschrieben [1].

Aspergillus-Mykosen weisen eine steigende Tendenz auf. Dies ist als Folge der zunehmenden Zahl opportunistischer Infektionen zu betrachten sowie als Folge der technischen und medikamentösen Entwicklung in der Medizin. In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Inzidenz, vor allem der invasiven Form der Aspergillose, deutlich zugenommen [5,6,7,8,9]. Disponierend für die Entwicklung solcher Infektionen sind prolongierte Neutropenie, immunsuppressive und myeloablative Therapien mit verminderter T-Zellfunktion, humorale Immundefekte und die Schädigung lokaler Barrieren [10].

Angesichts des erhöhten Infektionsrisikos, dem myelosuppressiv behandelte Patienten ausgesetzt sind, wurden in die letzten Jahren verschiedene präventive Maßnahmen, therapeutische Strategien und labordiagnostische Untersuchungen diskutiert.

1.1 Taxonomie und Morphologie

Thom und Church waren 1926 die Ersten, die versucht haben, die Gattung Aspergillus zu klassifizieren. Sie ordneten 69 Spezies in 11 Gruppen ein. 1945 akzeptierten Thom und Raper 80 Spezies. 20 Jahre später, 1965, ordneten Raper und Fennel 151 Spezies in 18 Gruppen ein [1]. Heute schließt die Aspergillus-Gattung mehr als 185 Spezies ein. Davon erwiesen sich etwa 20 Spezies als opportunistische Erreger beim Menschen. Unter diesen kommt Aspergillus fumigatus als die häufigste humanpathogene Spezies vor, gefolgt von Aspergillus flavus, A. niger, A. clavatus, A. nidulans, A. oryzae, A. terreus, A. ustus und A. versicolor sowie anderen.

Tabelle 1: Taxonomische Klassifikation

Reich	Fungi
Abteilung	Ascomycota
Ordnung	Eurotialen
Familie	Trichocomaceae
Gattung	Aspergillus

.

Aspergillen sind filamentäre, ubiquitär vorkommende Pilze. Sie wachsen auf abgestorbenen Blättern, in gelagertem Getreide, in Komposthaufen, im Heu und generell in sich zersetzendem Pflanzenmaterial.

1.1.1 Mikroskopische Merkmale der Aspergillus-Spezies

Sie gehören zu den höheren Pilzen, d.h. sie bilden ein septiertes Myzel. Myzelen sind eine Art Geflecht und entstehen als seitliche Ausstülpungen der Hyphen. Die Hyphe, ein fadenförmiger Zellverband, bildet die Grundform der Aspergillen. Sie „trägt“ die Konidienträger. Diese enden in einer Vesicula, auf der eine Reihe von den flaschenförmigen Phialiden sitzt. Aus den Phialiden

entsteht durch Knospung die Reihe der Konidien. Dies sind asexuelle Sporen (ungeschlechtliche Sporen, als Nebenfruchtform) und deshalb werden Aspergillen zu den Fungi imperfecti gezählt.
Die Morphologie der Konidien und Konidienträger dient in erster Linie der Identifikation der verschiedenen Aspergillus-Spezies.
Aspergillus fumigatus z. B. als häufigste humanpathogene Aspergillus-Spezie ist gekennzeichnet durch grüne Konidien mit einem Durchmesser von 2,5 bis 3µm. Sie entstehen aus 6 bis 8 grünlichen Phialiden mit einem Durchmesser von 2 bis 3µm [11,12,13].

Tabelle 2: Mikroskopische Merkmale verschiedener Aspergillus-Spezies

Spezies	**Konidiophoren**	**Vesicula**	**Phialiden**
A. fumigatus	ca.300µm lang, 5-8µm breit, farblos oder grünlich	säulenförmig	einreihig
A. flavus	ca.400-850µm lang, 20µm breit, farblos	strahlenförmig	ein- oder zweireihig
A. niger	ca.400-3000µm lang, 15-20µm breit, farblos oder bräunlich	strahlenförmig	zweireihig
A. nidulans	glatte Oberfläche, bräunlich	säulenformig	kurz

1.1.2 Makroskopische Merkmale der Aspergillus-Spezies

Zur Spezies-Identifikation gelten Wachstumsrate, Koloniefarbe und Thermotoleranz als wichtigste makroskopische Differenzierungskriterien.
Im Allgemeinen ist die Wachstumsrate der Aspergillen sehr groß. Sie können in 7 Tagen bei 25°C auf Czapek-Ager eine Größe mit einem Durchmesser von 1 bis zu 9cm erreichen. Eine Ausnahme bilden Aspergillus nidulans und Aspergillus glaucus, die unter gleichen Bedingungen 0,5 bis 1cm wachsen können.
Oberfläche und Farbe der Kolonien können ebenfalls von Spezies zu Spezies

variieren. Aspergillus fumigatus wächst in Form wattiger bis pudriger Kolonien, die je nach Alter weiß bis blaugrün gefärbt sein können.
Zur Differenzierung dient auch die Thermotoleranz. Aspergillus fumigatus ist ausgesprochen thermotolerant und wächst in einem weiten Temperaturbereich von 12°C bis 55°C, während andere humanpathogene Aspergillus-Spezies bei Temperaturen von 35° C bis 37°C wachsen können [11,12,13,69].

Tabelle 3: Makroskopische Merkmale verschiedener Aspergillus-Spezies

Spezies	**Koloniefarbe**
A. fumigatus	weiß bis blaugrün je nach Alter
A. flavus	gelb bis grün
A. niger	schwarz
A. nidulans	grün oder gelb

Der Bedarf an einer besseren Differenzierung der Aspergillus-Spezies führte neben den morphologischen auch zur Einführung von biochemischen und molekularen Kriterien [4]. Vor allem sekundäre Metaboliten und die Analyse von DNA haben sich als wichtige Hilfsmittel bei der Klassifizierung der Aspergillen erwiesen.

1.2 Epidemiologie

Die Aspergillose ist eine weltweit verbreitete Erkrankung. Invasive Infektionen kommen am häufigsten bei abwehrgeschwächten Patienten vor, insbesondere bei Patienten in Neutropenie und unter langdauernder immunsuppressiver Therapie [14]. Aufgrund der zunehmenden Zahl solcher Patienten und trotz signifikanten Fortschritten im Management dieser Fälle ist die Inzidenz der invasiven Aspergillose deutlich angestiegen [5,6,7,8].
Studien zufolge, die zwischen den Jahren 1978 und 1992 im Universitätsklinikum Frankfurt/Main durchgeführt wurden, stieg die Prävalenz der invasiven Mykosen von 2,2% (1978-82) und 3,2% (1983-87) zu 5,1% in den

Jahren danach. Das lag vor allem an der Zunahme der Aspergillus-Infektionen, während die Zahl der Candida-Infektionen stabil blieb oder sogar zurückgegangen ist. Die höchsten Infektionsraten fand man in aplastischen Syndromen (68%), gefolgt von akuter myeloischer Leukämie (25%) und AIDS (19%). In den meisten Fällen (76%) hing die Todesursache direkt mit der invasiven Mykose zusammen [3].

1.3 Pathogenese

Der Befall eines Organismus vom Aspergillus hängt sowohl vom Pilz als auch vom Wirt ab.

Aspergillus verfügt über unterschiedliche Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren.

Wesentliche Voraussetzung für das Eindringen des Fungus im Wirt ist sein Adhäsionsvermögen. Dieses wird vermittelt vor allem durch das Vorhandensein von Sialic-acid-spezifischem Lektin auf der Konidienoberfläche und seine Fähigkeit sich an Fibrinogen und Laminin zu binden [15,16,17,18].

Zu den Virulenzfaktoren von Aspergillus gehören unter anderen Gliotoxin, das die DNA-Fragmentation in den Makrophagen bewirkt und die Protein-Synthese hemmt [19,20], die Produktion von Katalasen [21], die Sekretion von extrazellulären Proteinasen und Ribonukleotoxin [18], Phospholipasen, Hämolysin und Aflatoxin [1].

Außerdem bietet dem Fungus die Pigmentierung seiner Konidien Schutz vor Oxidationsschaden und Phagozytose [22]. Nicht pigmentierte Konidien sind weniger resistent und zeigen eine verminderte Virulenz [23].

Nachdem die Konidien in den Respirationstrakt gelangen, quellen sie dort auf, keimen zu Hyphe aus und dringen als solche in das Lungengewebe ein. Während bei intakter Wirtsabwehr die inhalierten Konidien von Alveolarmakrophagen phagozytiert werden [24,25], werden die Hyphen von polymorphonukläeren Neutrophilen durch Freisetzung von mikrobiziden Metaboliten abgetötet [26]. Neben Neutrophilen scheinen auch Thrombozyten eine entscheidende Rolle in der Abwehr gegen Aspergillus-Hyphen zu spielen [27]. Sind diese natürliche Abwehrmechanismen geschädigt, wie das der Fall

z.B. bei Neutropenie, Thrombozytopenie, Therapie mit zytotoxischen Medikamenten wie Cyclosporin [28] oder mit supraphysiologischen Dosen von Nebennierenglukokortikoiden [24,29] ist, können die Hyphen in das Gewebe einfallen. Charakteristisch für die Hyphen ist der Befall der Blutgefäße mit nachfolgenden Thrombosen, hämorrhagischen Infarkten und Nekrosen [27].

1.4 Klinik

Aspergillus kann auf unterschiedliche Weise den Organismus befallen und schädigen. Eintrittspforten für den Fungus stellen der Respirationstrakt, die Haut, offene Wunden, Kornea oder die Ohren dar.

Invasive pulmonale Aspergillose. Die invasive Aspergillose entsteht bei immunsupprimierten Patienten, vor allem bei Patienten mit akuter Leukämie und Empfängern von Gewebetransplantationen. Sie manifestiert sich zunächst mit Fieber, das nicht auf Breitspektrum-Antibiotika anspricht. Thoraxschmerzen, Husten und Hämoptysen können auch im Rahmen der Erkrankung beobachtet werden. Die Erkrankung kann sich per continuitatem in benachbarten Organen ausdehnen und durch hämatogene Streuung Gehirn, Auge und andere Organe befallen. Die radiologischen Befunde variieren. Thorax-Röntgenbilder können zu Beginn unauffällig sein. Die Computertomographie kann Läsionen zeigen, die bei Röntgenbildern nicht zu sehen sind [29,30,31].

Aspergillom. Hier handelt es sich um einen kompakten „Pilzball“ aus Myzelien, der sich in präformierten Höhlen ausdehnt ohne in das Parenchym einzudringen. Das Aspergillom entspricht also eher einer Kolonisation. Es kann ein solches Ausmaß annehmen, dass es einen Durchmesser von mehreren Zentimetern erreicht. Es sind vor allem Lungenzysten und Kavernen bei Patienten mit zugrunde liegenden Lungenerkrankungen, die sich für die Entwicklung der Krankheit bieten. Patienten mit Aspergillom können asymptomatisch bleiben. Das am häufigsten vorkommende Symptom, das auch mit dem Ausmaß der Hyphenknäule korreliert, ist die Hämoptyse. Seltener kann es zu bakteriellen Superinfektionen kommen [29,30,32].

Allergische pulmonale Aspergillose. Sie ist charakterisiert durch Asthma

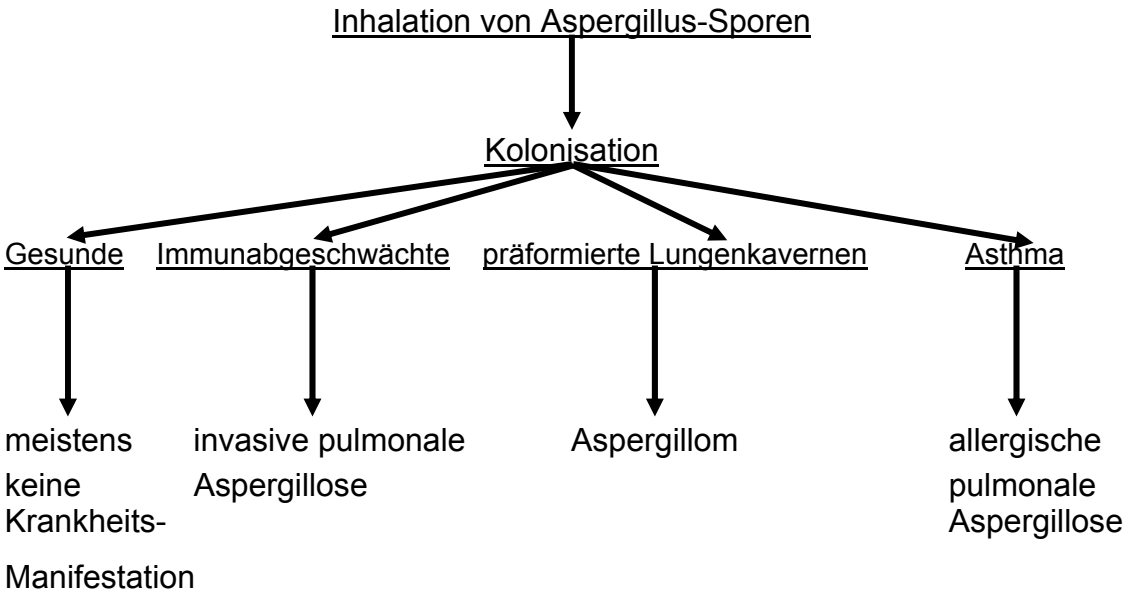
bronchiale und Eosinophilie, IgE-Antikörper gegen Aspergillus und flüchtigen pulmonalen Infiltraten, die infolge Verlegung der Bronchien mit zähflussigem Schleim entstehen [33,34].

Aspergillus-Endokarditis. Die Infektion entsteht vor allem im Rahmen von Klappenersatz-Operationen. Auch Patienten mit lang liegenden Zentralvenenkatheter und Drogenabhängige sind gefährdet [35].

Aspergillus-Endophthalmitis und -Keratitis. Eine Aspergillus-Endophthalmitis entsteht meistens durch hämatogene Streuung, als Folge einer Kornea-Infektion oder direkt durch Trauma. Eine Aspergillus-Keratitis kann ebenfalls sekundär oder primär durch direkte Verletzungen entstehen.

Aspergillus-Sinusitis. Die klinische Manifestation der Erkrankung variiert. Sie kann sich von einer oberflächlichen Infektion der Schleimhaut bis zur Invasion und lokalen Destruktion des angrenzenden Knochens mit endokraniellen und orbitalen Komplikationen oder sogar bis zur Sepsis erstrecken.

Otitis externa. Das Wachstum von Aspergillus im Cerumen und Dentritus innerhalb des äußeren Gehörganges führt zu einer Entzündung, die durch schmierige, fötide Sekretion, schmerzhafte Schwellung oder Juckreiz charakterisiert ist [31,32].



1.5 Diagnostik

Für die Labordiagnostik stehen mikroskopische, kulturelle, serologische und molekularbiologische Methoden zur Verfügung [36].

Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterialien für kulturelle Untersuchungen kommen Respirationssekrete, Abszesspunktate, Abstriche und Biopsien in Frage. Kulturen von Blut und Liquor cerebrospinalis sowie Knochenaspirate bleiben meistens negativ. Im Serum ist der Nachweis von Aspergillus-Antigen und Aspergillus-Antikörper möglich.

Mikroskopischer Erregernachweis

Dieses Verfahren ermöglicht einen schnellen Nachweis von Pilzelementen. Durch direkte mikroskopische Untersuchung können Befunde über die Hyphen und die charakteristischen Konidiophoren erhoben werden. Bei Schnittpräparaten von Gewebeproben werden Spezialfärbungen, wie die Periodsäure-Schiff-Färbung nach Grindley, die Methenamin-Silber-Färbung nach Grocott-Gomori oder die Mucicarmin-Färbung eingesetzt. Für respiratorische Sekrete kommen Färbungen wie die nach Gram oder Giemsa in Betracht. Eine wichtige Ergänzung der genannten Verfahren stellt die Fluoreszenzmikroskopie dar. Diese lässt sich durch Färbung mit optischem

Aufhellern und simultaner Mazeration von begleitendem Gewebe mit Kalilauge erzielen. Auch immunhistochemische Untersuchungen werden zur mikroskopischen Abgrenzung von Aspergillen eingesetzt.

Kultureller Erregernachweis

Die Anzucht von Aspergillus-Arten gelingt auf Sabouraud-Agar und anderen einfachen Nährböden bei 25°C-37°C nach zwei bis drei Tagen. Aspergillus-Kulturen erlauben nicht nur die definitive Diagnose einer manifesten Infektion, sondern auch eine Spezies-Identifizierung und Resistenztestungen [12].

Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich sowohl bei mikroskopischen als auch bei kulturellem Erregernachweis um eine Kontamination handeln könnte und nicht um einen relevanten Krankheitserreger. Die definitive Diagnose einer manifesten Infektion erfordert den mikroskopischen und kulturellen Erregernachweis aus Gewebeproben. Diese Kombination erhärtet die Diagnose.

Antigennachweis

Es handelt sich um den Nachweis von Polysaccharid- und Glykoprotein-Antigene im Serum und Urin. Verschiedene Verfahren werden zu diesem Zweck eingesetzt.

Der Latex-Agglutinationstest ist allgemein verfügbar. Er erfordert den Einsatz von monoklonalen Antikörpern mit einer Spezifität für die ß-D-Galactofuranosid-Seitenkette des Aspergillus-Galactomannans. Der Test ist zwar spezifisch, zeigt aber eine geringe diagnostische Sensitivität von ca. 30% [37].

Besser geeignet für den Antigennachweis erscheint das Verfahren von Sandwich ELISA. Im Vergleich zum Latex-Agglutinationstest ist Sandwich ELISA sensitiver, reproduktiver und erlaubt die Frühdiagnose einer invasiver Aspergillose. Mit Sandwich ELISA gelingt nämlich der Nachweis von Aspergillus-Galactomannan 2-3 Wochen früher als mit dem Latex-Agglutinationstest. Bei manchen Patienten wurde sogar Galactomannan im Serum nachgewiesen vor der klinischen Manifestation einer invasiven Aspergillose. Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation zwischen Antigenkonzentration und Ausbreitungsgrad der Aspergillose [38,39,40,41].

Antikörpernachweis

Der Nachweis von aspergillusspezifischen IgG- und IgE-Antikörper erfolgt mittels indirekten Hämagglutinationstests oder Enzymimmunoassay. Beide Methoden weisen in erster Linie auf das Vorliegen einer allergisch bronchopulmonalen Aspergillose oder eines Aspergilloms hin und beide haben eine geringe diagnostische Spezifität und Sensitivität. Es kann vor allem bei immunsupprimierten Patienten, infolge gestörter Antikörperbildung, der Titeranstieg ausbleiben [42].

Molekularbiologische Diagnostik

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hat sich seit ihrer Einführung im Jahre 1985 zu einem elementaren und unerlässlichen Verfahren für die medizinische Forschung und Diagnostik entwickelt. Sie ist eine in vitro Technik, die die Vervielfältigung einer spezifischen Nukleotidsequenz eines bestimmten Organismus erlaubt. Für die erfolgreiche Amplifikation einer DNA-Sequenz werden geeignete, kleine, synthetische DNA-Stücke, die Primers, eingesetzt.

Der Nachweis von Aspergillus-DNA kann aus verschiedenen klinischen Proben erfolgen, wie aus bronchoalveolären Lavagen (BAL), Vollblut, Plasma oder Serum.

Um eine invasive Aspergillose mittels PCR möglichst früh zu diagnostizieren wird der Einsatz von BAL-Proben als viel versprechend behauptet [43]. Der Grund dafür ist, dass die meisten Aspergillus-Infektionen primäre bronchopulmonale Infektionen sind, die nur sekundär, abhängig vom Immunstatus des Hosts, zu einer hämatogenen Ausstreuung führen. Da Aspergillen ubiquitär vorkommende Pilze sind, stellen Kontaminationen den wichtigsten Nachteil bei der Durchführung einer PCR mit BAL-Proben dar [44]. In der Literatur wurde eine Rate von 20% falsch positiven Ergebnissen aus Sputum Proben beschrieben.

Die PCR mit Vollblut- oder Serum-Proben zeigt sich gegenüber der mit BAL-Proben überlegen. Vollblut und Serum sind vor allem einfacher zu gewinnen. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass eine solche PCR sehr große diagnostische Spezifität und Sensitivität hat. Vor allem bei PCR mit Vollblutproben, liegen Sensitivität und negativer Vorhersagewert bei 100%. Für

PCR mit Serumproben wurde von 55-70%iger Sensitivität und 23-53%igem negativem Vorhersagewert berichtet [45,46,47,48,49].

Tabelle 4: PCR-Ergebnisse aus Serum- und Blutproben in verschiedenen Studien für den Nachweis der invasiven Aspergillose

Quellen-angabe	Probe	Fälle	Erhe-bung	Spezifi-tät in %	Sensiti-vität in %	neg. Vor-hersage-wert	pos. Vor-hersage-wert
Yamakami [45]	Serum	20	retro-spektiv	100	70	23	100
Einsele et al [46]	Blut	13	retro-spektiv	100	100	100	100
Hebart et al [48]	Blut	8	pro-spektiv	56	100	100	22
Raad et al [47]	Blut	18	pro-spektiv	100	57-100	92-100	100

Light-Cycler ist ein PCR-Gerät, das die schnelle in vitro Amplifikation von DNA erlaubt. Es ermöglicht die Durchführung einer kompletten PCR in speziellen Kapillaren innerhalb von 20-30min. Da diese Kapillaren während des ganzen Verfahrens geschlossen bleiben, sinkt die Gefahr einer Kontamination. Außerdem ist die Methode reproduktiv, präzis, sensitiv und erlaubt den Einsatz von verschiedenen spezifischen Oligonukleotiden in einem einzigen Reaktionsmix [50].

1.6 Candida albicans

Neben Aspergillus steht auch Candida als weitverbreiteter opportunistischer Erreger mit humanmedizinischer Bedeutung im Vordergrund [72].

Von den ca. 150 Arten der Gattung Candida kommt am häufigsten Candida albicans vor, gefolgt von C. tropicalis, C. parapsiloris, C. guilliermondii, C. pseudotropicalis, C. krusei, C. stellatoidea sowie C. glabrata (früher Torulopsis glabrata) [13].

Mikroskopische Merkmale

Die ca 4-8µm großen Sprosspilze der Gattung Candida können grampositive ovale, rundliche oder längliche Einzelzellen sein. Sie sind in der Lage lange verzweigte Strukturen, die Pseudomycelen, zu bilden. Für C. albicans ist die Bildung von Chlamydosporen charakteristisch. Es handelt sich um runde, dickwandige Zellen, die der Austrocknung besser widerstehen [11,12,13].

Makroskopische Merkmale

Anzucht erfolgt leicht auf verschiedenen Nährböden. Sie wachsen z. B. gut auf Sabaround-Glucose-Agar bei 37°C, wobei sich nach 1-2 Tagen weiße, porzellanartige Kolonien bilden [11,12,13].

Pathogenese

Die meisten Candida-Infektionen sind endogenen Ursprungs und die Sprosspilze erlangen eine pathogene Bedeutung erst bei einer Störung der Abwehrmechanismen des Wirts.

Diese Abwehrmechanismen sind noch nicht völlig aufgeklärt. Einer Candidiasis stehen folgende Barrieren entgegen:

- Haut und Schleimhaut
- zelluläre und humorale Abwehrmechanismen.

Die Störung dieser Barrieren kann die Folge einer Therapie mit Breitspektrumantibiotika oder mit Immunsuppressiva sein. Sie kann auch Folge einer hormonellen Umstellung sein, wie das der Fall bei einer Schwangerschaft ist oder Folge einer Erkrankung wie Diabetes mellitus.

Häufig geht einer Candida-Infektion eine verstärkte Kolonisation der Oberfläche mit dem Sproßpilz voraus. Candida kann von der kolonisierten Oberfläche in tiefes Gewebe eindringen, wenn Haut und Schleimhaut verletzt werden. Wichtig dabei ist die Adhärenzfähigkeit der Candida sowohl an Epithelzellen der Schleimhaut als auch an Plastikmaterialien (z. B. Venen- oder Urinkatheter) [12,13].

Klinik

Oberflächliche Candida-Infektionen manifestieren sich u.a. als Mundsoor, Ösophagitis, Zystitis, Pyelitis, Vaginitis, Balanitis oder als Onychomykose. Eine hämatogene Streuung kann im Prinzip jedes Organ oder Organsystem

involvieren und ein breites Spektrum von Krankheiten verursachen. Insbesondere werden Meninx, Auge, Lunge, Endokard, Leber, Niere, Skelett und Gefäßsystem von Candida befallen. Das Krankheitsspektrum ist entsprechend variabel, angefangen von Fieber bis hin zu septischem Schock [29].

Diagnostik

Für die Diagnose stehen mikroskopische, kulturelle und molekularbiologische Methoden zu Verfügung.

Eine Candida-Endomykose gilt bis jetzt als gesichert, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt ist:

- mikroskopischer oder kultureller Erregernachweis in normalerweise sterilen Flüssigkeiten
- kultureller oder histologischer Erregernachweis in Gewebebiopsien
- wiederholter Erregernachweis in Blutkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zusätzlich zu den o.g. Nachweismethoden und obwohl sie noch nicht die gleiche Aussagekraft haben, nehmen in der Diagnostik der Candida-Infektionen folgende Nachweisverfahren eine besondere Stellung ein:

- Antigennachweis: zum Nachweis des hitzestabilen Antigens oder des Mannan-Antigens mittels Latex-Agglutination
- Antikörpernachweis: häufig verwendete Testverfahren sind die indirekte Hämagglutination, die indirekte Immunfluoreszenz und das Enzymimmunoassay
- Metabolitennachweis: im Serum können D-Mannose und D-Arabinitol als Stoffwechselprodukte von Candida nachgewiesen werden
- PCR zum Nachweis von Candida-DNA.

Der regelmäßige Einsatz dieser Nachweisverfahren kann die Überwachung von Risiko-Patienten unterstützen oder das Endomykose-Risiko erkennen [51,73].

1.7 Therapie

Da Pilzinfektionen, vor allem in ihrer invasiven Form, bei Patienten in Neutropenie und nach Knochenmarktransplantation zunehmend eine wichtige

Komplikationsquelle darstellen, steht die Optimierung der Therapie und hauptsächlich der effektiven Prophylaxe solcher Infektionen an erster Stelle.
Zur Verfügung stehen u.a. die Azol-Antimykotika Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol sowie die Polyen-Antibiotika Amphotericin B, Natamycin und Neomycin.
Amphotericin B ist ein Antibiotikum mit breitem Wirkungsspektrum. Es wird zur Behandlung von Infektionen mit Candida, Cryptococcus neoformans und Aspergillus eingesetzt. Zur systemischen Therapie wird Amphotericin B intravenös zugeführt, wobei sich eine Kombination mit Flucytosin häufig bewährt. Bei den Nebenwirkungen von intravenös gegebenem Amphotericin B steht seine Nephrotoxizität im Vordergrund. Sie ist hauptsächlich von der Gesamtdosis abhängig. Um die Nebenwirkungen von konventionellem Amphotericin B einzuschränken, wurde das liposomale Amphotericin B eingeführt. Einer randomisierten Studie zufolge, hat liposomales im Vergleich zu konventionellem Amphotericin B, bei der gleichen Tagesdosis (1mg/kg KG), besser abgeschnitten [52].
Fluconazol, Itraconazol und das neu entwickelte Voriconazol gehören zu den Triazol-Derivaten. Sie können zur systemischen Therapie recht gut eingesetzt werden. Sie werden enteral gut resorbiert und deshalb sind sie häufig zur oralen Zufuhr geeignet. Sie haben ein breites Wirkspektrum, sind in relativ geringer Dosierung bereits ausreichend effektiv und relativ gut verträglich. Fluconazol hat eine hohe orale Bioverfügbarkeit und die für die Triazol-Derivate typische fungistatische Wirkung. Es hat sich eine hohe Wirksamkeit gegen Candida albicans gezeigt, aber auch eine natürliche Resistenz gegen Candida krusei und Aspergillus. Auf der anderen Seite ist Itraconazol auch gegen Aspergillus wirksam. Es zeigt aber eine variable orale Verfügbarkeit. Sie wird nämlich erhöht durch gleichzeitige Nahrungsaufnahme und erniedrigt bei Hypoazidität. Auch Voriconazol wird erfolgreich gegen Aspergillus-Spezies eingesetzt [53]. In einer randomisierten klinischen Studie wurde versucht, die Effektivität von Voriconazol im Vergleich zu Amphotericin B bei der Behandlung von neutropenischen Patienten zu überprüfen. Diese hat gezeigt, dass bei Patienten mit invasiver Aspergillose die Initial-Therapie mit Voriconazol bessere

Ergebnisse erzielte als die Standard-Therapie mit Amphotericin B. Die Erkrankung sprach besser auf das Triazol-Derivat an, die Überlebensrate war besser und schwere Nebenwirkungen traten nicht so oft auf [54,55].
Bei einer Aspergillose in den Bronchien oder in Kavernen hat die systemische antimykotische Therapie keine Wirkung. Im Falle eines Aspergilloms in der Lunge und bei nicht stark eingeschränkter Lungenfunktion kann eine Lobektomie indiziert sein [56].

1.8 Prävention und Prophylaxe

Verschiedene präventive Strategien und prophylaktische Maßnahmen wurden in den letzten Jahren diskutiert und eingesetzt.
Wichtig ist es, Hochrisiko-Patienten zu erkennen und rechtzeitig zu therapieren. Dazu gehören u.a. Patienten mit schwerer und langanhaltender Neutropenie, verminderter T-Zellfunktion und humoralem Immundefekt sowie diejenige unter Chemotherapie und in schlechtem Ernährungszustand. Bei solchen Patienten ist eine Expositionsprophylaxe durch Umkehrisolierung durchzuführen. Es sind vor allem Luft und Nahrung frei von Pilzsporen zu halten, da sie die Hauptinfektionsquellen für Aspergillus darstellen. Im Hospitalbereich kann eine annähernd konidienfreie Luft durch den Einsatz von HEPA (High-Efficiency Particulate Air)-Filtern erreicht werden. Immer wieder wird diskutiert, inwieweit Amphotericin B inhalativ oder niedrig dosiert intravenös prophylaktisch eingesetzt werden kann. Inzwischen wird zur Prophylaxe zunehmend häufiger Itraconazol eingesetzt.

1.9 Fragestellung und Zielsetzung

Die zunehmende Zahl der Aspergillus-Infektionen bei Risikopatienten macht ihre schnelle und zuverlässige Diagnostik erforderlich. Entscheidend für die Diagnose solcher Infektionen ist das Risiko ihres Auftretens überhaupt zu erkennen und sind labordiagnostische Untersuchungen zu veranlassen. Da die diagnostische Wertigkeit von Antikörper- und Antigennachweis des Aspergillus durch geringe Spezifität und Sensitivität eingeschränkt ist, erfordert die definitive Diagnose einer manifesten Infektion den histopathologischen und kulturellen Nachweis aus Gewebeproben. Öfters wurde die Frage gestellt, ob molekularbiologische Verfahren früh eine höhere Sensitivität und Spezifität erreichen können.

Das Ziel dieser Arbeit ist, verschiedene Methoden zur Amplifikation und Detektion von Aspergillus-DNA im Blut von hämatologischen Patienten zu vergleichen.

Verglichen wurden drei Testverfahren, nämlich PCR-ELISA, Light-Cycler und die DNA Test Strips von Roche.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Diese Arbeit wurde im Rahmen einer multizentrischen, randomisierten Studie durchgeführt. Es wurden retrospektiv Blutproben aus insgesamt 29 Patienten der Kontrollgruppe bearbeitet. Dabei handelte es sich um hämatologische Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation (KMT) oder nach Transplantation peripherer Blutstammzellen (PBPCT), bei denen sowohl eine Allergie gegen liposomales Amphotericin B (AmBisome), als auch eine aktive invasive Pilzinfektion ausgeschlossen werden konnte. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis zum Tag 100 nach einer Stammzell-Transplantation (SCT).

Zur effektiven Prophylaxe vor Pilzinfektionen erhielten Patienten der Kontrollgruppe das Azolantimykotikum Fluconazol (200mg/Tag) und das Polyenantibiotikum Amphotericin B (4mal tgl. 5mg/Tag). Im Falle von Fieber in der neutropenischen Phase, das auf Breitbandantibiotika auch 120 Stunden nach Therapiebeginn nicht ansprach, erhielten die Patienten für mindestens 7 Tagen AmBisome (3mg/kg KG).

2.2 Materialien

2.2.1 Untersuchungsmaterial

Die molekularbiologische Diagnostik wurde an EDTA antikoagulierten Blutproben durchgeführt. Die Probennahme erfolgte zweimal pro Woche bis zum Tag 100 nach der Stammzell-Transplantation. Die Extraktion der Pilz-DNA erfolgte am Tag der Abnahme. Anschließend wurden die extrahierten DNA-Proben bei –20°C tiefgefroren. Die Aufarbeitung der Kontrollproben erfolgte nach Tag 100, d.h. nachdem die Patienten aus der Studie waren, um eine Einflussnahme auf das Management der Therapie dieser Gruppe durch ein PCR-Resultat zu vermeiden.

2.2.2 Geräte

Biofuge 13		Heraeus,Hanau
Centrifuge	5415R	Eppendorf, Hamburg
Drucker	LaserJet III	Hewlett Packard
ELISA-Reader	Rainbow	SLT, Crailsheim
ELISA-Rüttler	MSI	
LC Carousel Centrifuge		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light-Cycler		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR-Prozessor	GeneAmp 2400	Perkin Elmer, USA
	GeneAmp 9600	Perkin Elmer, USA
Wärmeschrank		Bachofer, Reutlingen

2.2.3 Verbrauchsgegenstände

DNA Detection Test Strips	No.1 965 484	Boehringer, Mannheim
Pipetten	Variopipetten	Eppendorf, Hamburg
Light-Cycler Kit	No.3 003 248	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lyticase		SIGMA, Deisenhofen
Lyticase „rekombinant“		SIGMA, Deisenhofen
Oligonukleotiden		Roth, Karlsruhe
PCR-ELISA DetectionsKit	No.1 636 111	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

PCR-ELISA DIG Detection Kit	No.1 636 111	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QIAamp DNA Mini Kit	No.51306	QIAGEN GmbH, Hilden
Proteinase K		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Beim ersten Schritt der DNA-Extraktion werden die Erythrozyten lysiert. Zur Lyse wird das Blut mit 45 ml Red cell lysis buffer (RCLB) versetzt.

RCLB ist eine hypotone Salzlösung und weist folglich eine hämolysierende Wirkung auf. Im hypotonischen Medium strömt Flüssigkeit in den Erythrozyten ein bis ihre Membran platzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des RCLB.

RCLB	**Konzentration**
Tris pH 7,6	10 mM
Magnesiumchlorid	5 mM
Natriumchlorid	10 mM

Lagerung bei 4°C

Die mit RCLB-versetzte Blutprobe wird 10min lang auf eine Horizontalwippe bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10min bei 3000U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das Pellet wird erneut in 45ml RCLB aufgenommen. Die Prozedur wird insgesamt zweimal wiederholt.

Weiter wird das Pellet zur Lyse der Leukozyten mit 1ml White cell lysis buffer (WCLB) versetzt

Tabelle 6: Zusammensetzung des WCLB.

WCLB	**Konzentration**
Tris pH 7,6	10 mM
EDTA pH 8	10 mM
Natriumchlorid	50 mM
SDS	0,2 %
Proteinase K	200 µg/ml

Lagerung bei –20°C

Die Probe wird für 45min bei 65°C inkubiert und danach 10min lang bei 4000U/min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert.
Zum Pellet werden nun 500µl rekombinante Lyticase gegeben und für 45min bei 37°C inkubiert. Lyticase bewirkt die Bildung von kugeligen, vergrößerten Zellen, den Sphäroblasten, deren Wand weitgehend verdaut ist.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Lyticase-Puffer

Lyticase-Puffer	**Konzentration**
Tris pH 7,5	50 mM
EDTA	1 mM
ß-Mercaptoethanol	0,2 %
Rekombinante Lyticase	1 U/100µl

Lagerung bei –20°C

Anschließend wird die Probe 10min bei 400 U/min zentrifugiert, der Überstand wird abgegossen.

Zur Sphäroblastenlyse und Isolierung von DNA wird das Pellet zunächst in 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase K aufgenommen und für 20min bei 56°C inkubiert. Proteinase K ist endolytische Protease, die zur Inaktivierung von DNasen bei der Isolierung von DNA eingesetzt wird. Darauf wird die Probe mit

200µl AL-Puffer versetzt und für 10min bei 70 °C inkubiert. Anschließend werden 200µl 100%iges Ethanol dazugegeben.

Die gesamte Lösung wird nun auf Qiagen-Säulen aufgetragen und bei 9000U/min 1min lang zentrifugiert. Diese Qiagen-Säulen enthalten eine Silicamembran, die in der Lage ist, DNA während der Zentrifugation zu binden. Die an der Silicamembran gebundene DNA wird nun in zwei Schritte gewaschen und zentrifugiert, erst bei 9000U/min für 1min und dann bei 13000U/min für 3min. Verwendet werden zwei verschiedene Waschpuffer, AW1 bzw. AW2, die die Reinheit der eluierten DNA signifikant verbessern.
Zuletzt wird die DNA von der Silicamembran abgelöst. In einem ersten Schritt wird mit 50µl AE-Puffer eluiert und bei 9000U/min 1min lang zentrifugiert. In einem zweiten Schritt wird wiederum mit 50µl AE-Puffer eluiert und bei 13000U/min für 3min zentrifugiert.
Die DNA liegt nun im Eluat gelöst vor.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion, PCR

Amplifikation der Pilz-DNA zum Nachweis im ELISA

Zum Ansatz einer PCR benötigt man zunächst den sogenannten Mastermix. Dieses Reagenz enthält folgende Bestandteile, die eine spezifische Amplifikation der Zielsequenz erlauben:

1.PCR-Puffer, zur Erhaltung des richtigen pH-Werts und der Salzkonzentrationen.

2.Mg^{2+}, als Enzym-Cofaktor für die Taq-Polymerase.

3.Digoxigenin-markierte Nukleotide: dig-dNTP.

4.Zwei Primer:a) AFUMSPEZ : 5´>ACT GGC TGT GGG GGG AAC <3´

b) FUNG 2 : 5´>CCG ATC CCT ATG CGG CAT <3´

5.Taq-Polymerase, als Enzym für die Replikation von DNA.

Tabelle 8: Zusammensetzung von PCR-Mastermix

PCR-Mastermix	**Konzentration**	**Volumen**
H_2O	-	25,7µl
PCR-Puffer, 10x	1x	5,0µl
$MgCl_2$	1mM	2,0µl
dig-dNTP	200µM	5,0µl
AFUMSPEZ	25pM	10,0µl
FUNG 2	25pM	10,0µl
Taq-Polymerase	2,5U	0,3µl

Tabelle 9: Zusammensetzung von PCR-Puffer.

PCR-Puffer	**Konzentration**
Tris-HCl	100mM
$MgCl_2$	15mM
KCl	500mM

Das Endvolumen für die PCR beträgt 50µl. 10µl aus der extrahierten DNA-Probe werden in einem Röhrchen mit 40µl PCR-Mastermix pipettiert.
Der Prozess wird in einem Thermocycler GeneAmp 9600 oder GeneAmp 2400 von Perkin Elmer durchgeführt.

Temperaturprofil der PCR mit 34 Zyklen:

Initialdenaturierung	94°C	4min
Denaturierung	94°C	30s
Annealing	62°C	1min
Extension	72°C	2min
Terminale Extension	72°C	5min

2.3.3 PCR-ELISA

Zur Detektion des Digoxigenin-markierten PCR-Produktes wird nun die ELISA eingesetzt.
Die für die PCR-ELISA notwendigen Reagenzien werden vom Roche Kit verwendet. Dieses enthält:

- Digoxigenin-markiertes Kontroll-PCR-Produkt, aus dem eine Verdünnungsreihe hergestellt wird: 1:1, 1:10 und 1:100
- Biotin-markierte Kontrollprobe
- Denaturierungslösung, die NaOH enthält
- Hybridisierungslösung
- Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat zusammen mit Konjugationspuffer
- ABTS-Tabletten zusammen mit dem Puffer, in dem die Tabletten aufgelöst werden
- Waschtabletten
- Mikrotiterplatten und
- Abdeckfolien

Zusätzlich werden Biotin-markierte Oligonukleotiden benötigt:

A. fumigatus : 5´>CAT GGC CTT CAC TGG CTG TGG GGG GAA CCA

Candida: 5´>GGA CCA TCG TAA TGA TTA ATA GGG ACG

Beim ersten Schritt der PCR-ELISA werden jeweils 20µl PCR-Produkt in „Eppendorf cups“ pipettiert. Ebenfalls in „Eppendorf cups“ werden 20µl Wasser als negative Kontrolle pipettiert, sowie je 10 µl aus dem Kontrol-PCR-Produkt und seiner Verdünnungsreihe.
Gleich danach werden die Proben durch Zugabe von 20µl alkalischer Lösung denaturiert und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert.
Zur Hybridisierung werden nun 200µl Hybridisierugslösung dazugegeben. Diese enthält die Biotin-markierten Oligonukleotiden.

Anschließend werden 200µl aus dem Gesamtvolumen in der Mikrotiterplatte pipettiert. Diese Mikrotiterplatte ist mit Streptavidin beschichtet, einem kleinen bakteriellen Protein, das sich mit hoher Affinität an Biotin bindet. Nun wird die Platte bei 40°C für 3h inkubiert.

Beim nächsten Schritt wird die Mikrotiterplatte dreimal gewaschen und die Proben mit jeweils 200µl Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat bei 37°C für 30min inkubiert. Dieses Konjugat bindet sich nun an den Digoxigenin-markierten Amplifikaten, die über die Primer an der Mikrotiterplatte fixiert sind.

Danach wird das überschüssige Konjugat ausgewaschen und die Platte sechsmal gewaschen. Zur Farbentwicklung können jetzt jeweils 200µl ABTS Substrat zugefügt und bei 37°C für 30min inkubiert werden.

Die grüne Farbe, die das ABTS Substrat den Proben verleiht, kann leicht mit bloßem Auge beobachtet werden. Für ein quantitatives Ergebnis ist aber eine photometrische Messung nötig. Dies erfolgt mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405nm und einer Referenzwellenlänge von 492nm.

2.3.4 Light-Cycler

Der Light-Cycler ist ein PCR-Gerät, das die Durchführung einer kompletten PCR innerhalb von 20-30min ermöglicht. Im Light-Cycler wird für das Erhitzen der Proben Luft verwendet. Da die Luft praktisch keine Wärmekapazität besitzt wird der Prozess schneller durchgeführt als zum Beispiel mit einem konventionellen Thermoblock. Die PCR läuft in speziellen Borglaskapillaren ab. Diese Kapillaren besitzen ein günstiges Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, das ein schnelles Gleichgewicht zwischen warmer Luft und Proben erzielt. Diese Kombination, nämlich das Einsetzen von Luft und das große Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis der Kapillaren, ermöglicht, dass ein einziger PCR-Zyklus in weniger als 30s durchgeführt werden kann.
Insgesamt können 32 Proben in einem Arbeitszyklus bearbeitet werden. Diese sind in einem Karussell angeordnet.
Das optische System des Light-Cyclers verfügt über eine Licht-emittierende Diode (LED) und drei Messkanäle, die das emittierte Fluoreszenz-Licht bei drei verschiedenen Wellenlängen messen können: Kanal 1 für 530nm, Kanal 2 für 640nm und Kanal 3 für 710nm. Die Messzeit für jede Probe beträgt etwa 20ms.
Für die Messung der Fluoreszenz werden spezielle Sonden eingesetzt, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Zum sequenzspezifischen Nachweis von PCR-Produkten im Light-Cycler haben sich zwei Sonden durchgesetzt. Es handelt sich um zwei Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Hybridisierungssonden, markiert mit zwei verschiedenen Farben. Kommen die beiden Sonden sehr nah zu einander, findet ein Energietransfer statt, der als Fluoreszenz messbar ist (FRET). Die erste Hybridisierungssonde ist am 3´Ende mit Fluoreszein (F1, 530nm) markiert. Die zweite Hybridisierungssonde ist am 5´Ende mit Light-Cycler-Red 640 (LC Red 640) markiert. Fluoreszein wird durch das Licht aus der LED angeregt und emittiert ein grünes Fluoreszenzlicht. Die auf diese Weise freigesetzte Energie regt das LC Red 640 an. Dieses emittiert ein rotes Licht, dessen Intensität im Kanal 2 (F2, 640nm) des optischen Systems gemessen wird.

Tabelle 10: Light-Cycler-Sonden.

Kanal	Wellenlänge	Farbstoff
1	530	Fluoreszein
2	640	LC Red 640

Zum Ansatz einer Light-Cycler-PCR benötigt man 5µl DNA-Probe und 15µl Mastermix.

Tabelle 11: Light-Cycler PCR-Mastermix.

LC-Mastermix	Volumen
H_2O	3,6µl
$MgCl_2$	2,4µl
Primer	1,0µl
Fluoreszein	0,5µl
LC Red 640	0,5µl
LC-FastStart-Enzym	2,0µl

Temperaturprofil von Light-Cycler mit 45 Zyklen:

Initialdenaturierung	:	95°C	9min
Denaturierung	:	95°C	3s
Annealing	:	54°C	15s
Schmelzkurve	:	50°C	20s
Abkühlphase	:	40°C	3min

Quantifizierung der Zielsequenz im Light-Cycler- System

Um das Gerät zu kalibrieren, stehen fünf Verdünnungsreihen des Aspergillus fumigatus in den Konzentrationen 10^{1} bis 10^{5} CFU, entsprechend 100fg bis 1ng DNA, als Standards zur Verfügung. Deren Fluoreszenz-Signal wird in halb-logarithmischer Darstellung über der Messzyklus-Zahl dargestellt (Abb. 1). Für jede Konzentration wird diejenige Messzyklus-Zahl ermittelt, an der sich das Signal aus dem Rauschen erhebt. Auf diese Weise erhält man fünf als Crossing-Point bezeichnete Wertpaare, die vom Gerät in einem Diagramm dargestellt werden, in dem die ermittelte Messzyklus-Zahl über dem Logarithmus der Konzentration aufgetragen wird (Abb.2). Daraus werden die Parameter der linearen Progression bestimmt, mit deren Hilfe die Konzentration in der zu messenden Probe inter- bzw. extrapoliert wird (Abb. 3).

Das Detektionslimit liegt bei diesem Verfahren bei 5 bis 10 CFU/ml Blut, also 50 bis 100fg.

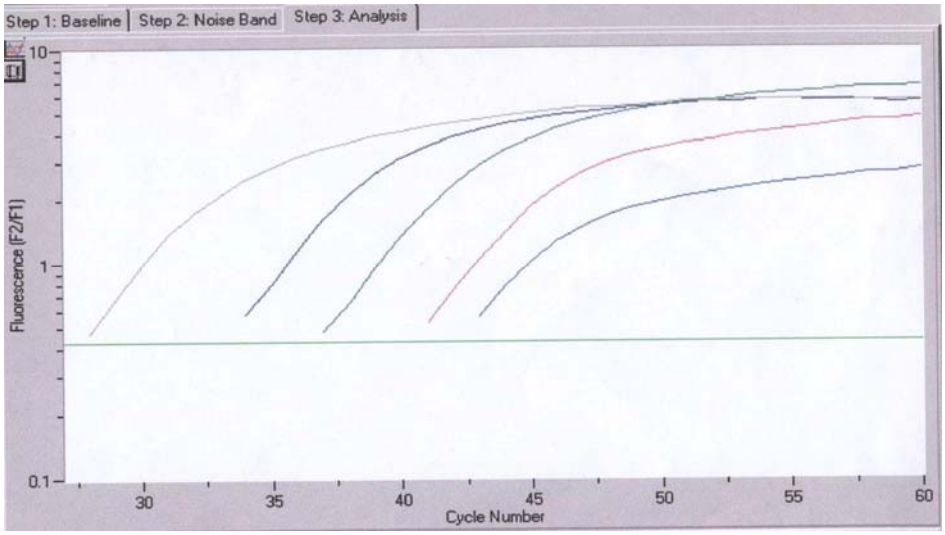


Abb. 1: Logarithmische Darstellung der Fluoreszenz über der Zyklusanzahl

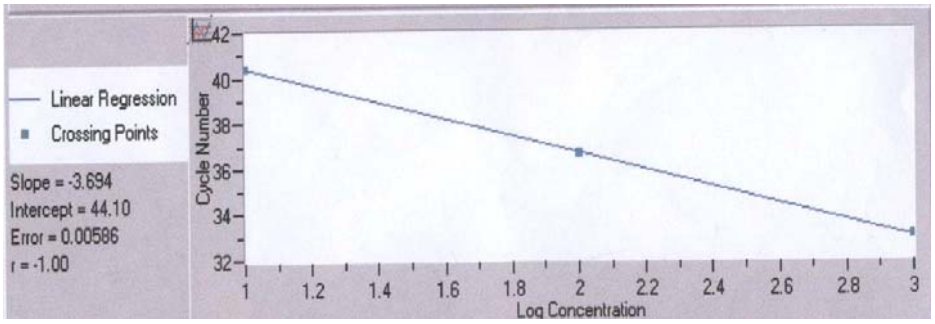


Abb. 2: Darstellung in Log-Normalverteilung von Crossing-Points (Zyklusanzahl) und Log-Konzentration der Standards

	P...	Name	Sta...	Calc...	Cro...
	1	Q Extr. 1		3.234	42.21
	2	Q Extr. 2			
	3	Q PCR 1			
	4	Q PCR 2			
	5	Asp. 10 1	10.00	9.807	40.43
	6	Asp. 10 2	100.0	104.0	36.64
	7	Asp. 10 3	1,000	980.7	33.04

Abb. 3: Errechnete Konzentration der Proben

2.3.5 DNA Detection Test Strips

Für den DNA-Nachweis mit den Test-Strips werden benötigt 4,5µl des Digoxigenin-markierten PCR-Produktes, hybridisiert mit 0,5µl Biotin-markierten Oligonukleotiden.

Tabelle 12 : Zusammensetzung von PCR-Mix für die Test-Strips

	Konzentration	**Volumen**
PCR-Produkt		4,5µl
Oligonukleotiden	0,5µM	0,5µl

Diese 5µl Hybridisierungslösung werden im Thermocycler zunächst bei 95°C für 5min denaturiert, anschließend bei 2000g zentrifugiert und schließlich wieder im Thermocycler 30min lang bei 40°C inkubiert.

Die Probe kann nun auf dem Test-Strip (Abb.4) appliziert werden. Ein solches Strip besteht aus:

a. dem Teil, das im chromatographischen Puffer eingetaucht wird

b. einem rot-gefärbten Polster, auf dem Anti-Digoxigenin-Monoklonale-Antikörper zu finden sind und die mit Gold-Partikeln konjugiert sind

c. dem Bereich, auf dem die Probe appliziert wird

d. einer Membran aus Nitrozellulose, die zur Immobilisierung von Digoxigenin-markiertem DNA eingesetzt wird. An dieser Membran sind zwei Linien verankert. Es handelt sich um eine Streptavidin-Linie, ein Protein mit hoher Affinität zur Biotin und um eine Linie mit polyklonalen Antikörpern

e. dem Absorptionspolster.

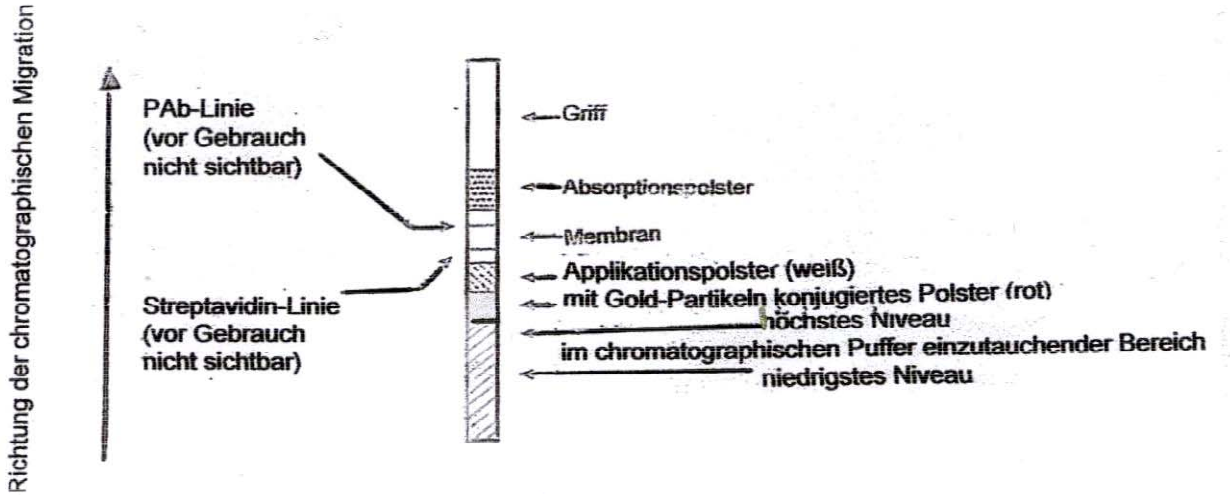


Abb. 4: Aufbau des Test-Strips

Das Test-Strip wird im chromatographischen Puffer eingetaucht und auf einer sauberen Fläche gelegt (Abb.5).

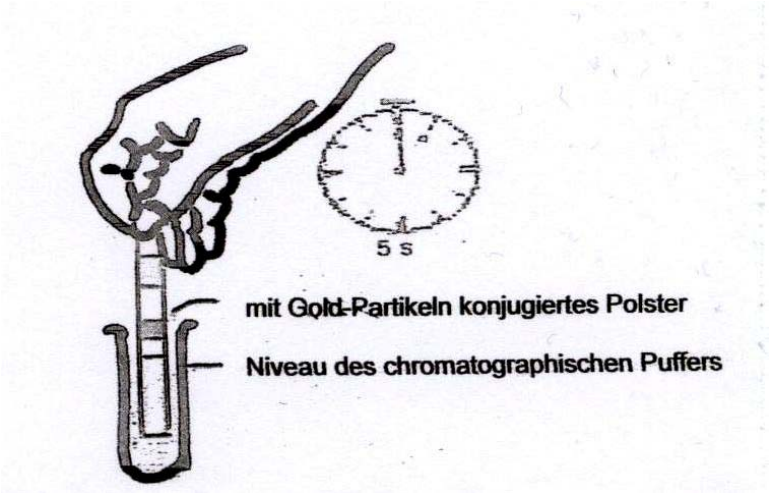


Abb. 5: Verwendung des Test-Strips

Der Puffer fließt den Strip entlang zunächst durch das rote Polster und nimmt das anti-DIG-Gold-Konjugat mit. Weiter, an der Applikationsstelle, bindet sich die DNA an das Konjugat und strömt Richtung Nitrozellulose-Membran. Während die gebundene DNA dem Streptavidin entlang fließt, bindet diese das Biotin, und die konjugierten Gold-Partikel bilden hier eine erste rote Linie. Das ungebundene Anti-DIG-Gold-Konjugat wandert weiter durch das Streptavidin, bindet sich nun an den polyklonalen Antikörper und bildet eine zweite rote Linie. Diese Linie dient als Kontrolle der chromatographischen Migration. Erscheint sie nicht, so ist das Resultat ungültig (Abb. 6).

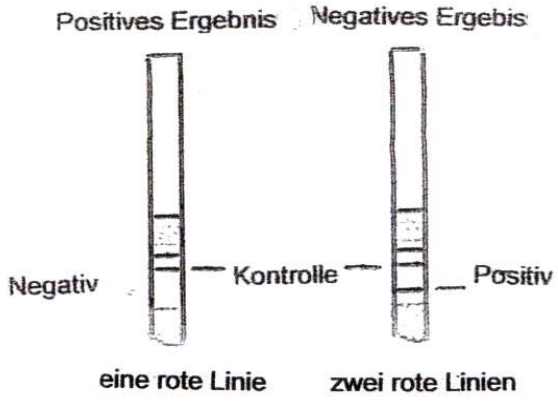


Abb. 6: Auswertung des Test-Strips

3. Ergebnisse

3.1 PCR-ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 507 Blutproben von 29 hämatologischen Patienten retrospektiv mit Hilfe der PCR-ELISA auf Aspergillus-DNA untersucht.

Tabelle 13: Demografische Daten der Patienten

Anzahl der Patienten	29
Patienten mit dokumentierter Aspergillose	1 (3,5%)
Patienten mit Verdacht auf Aspergillose	6 (22,5%)
Patienten ohne dokumentierte Aspergillose	22 (76,0%)
Geschlecht	
weiblich	13 (45,0%)
männlich	16 (55,0%)
Mittleres Alter (in Jahren)	33
Erkrankungen	
Leukämien	17 (58,6%)
Lymphome	7 (24,0%)
solide Tumoren	1 (0,40%)
Andere	5 (17,0%)
Therapeutischer Einsatz	
Transplantation Peripherer Blutstammzellen (PBSCT)	8 (28,0%)
Allogene Knochenmarktransplantation (KMT)	21 (72,0%)
Prophylaktische antimykotische Therapie	29 (100 %)
Empirische antimykotische Therapie mit AmBisome	10 (35,0%)

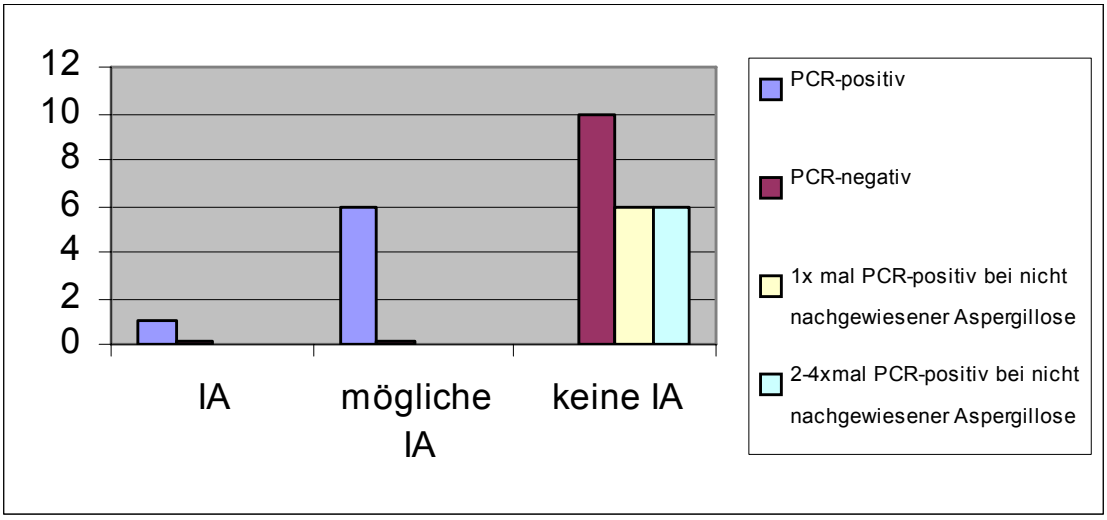


Abb. 7: Patienten-Gruppen mit PCR-positiven und -negativen Ergebnisse. IA: dokumentierte invasive Aspergillose, mögliche IA: Verdacht auf Aspergillose, keine IA: keine nachgewiesene Aspergillose

Legende Tabellen 10-21

Pat:	Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation (KMT) oder nach Transplantation peripherer Blutstammzellen (PBSCT).	
Alter:	Alter des Patienten im Beobachtungszeitraum, angegeben in Jahren.	
Diag(nose):	AA	Aplastische Anämie
	BDA	Blackfan Diamond Anämie
	ALL	Akute Lymphatische Leukämie
	AML	Akute Myeloische Leukämie
	CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
	CML	Chronische Myeloische Leukämie
	MDS	Myelodysplastisches Syndrom
	Osteop	Osteopetrosis
	Plasm	Plasmozytom
	Rhabdom	Rhabdomyosarkom
Tag:	Tag nach SCT.	

PCR: In vitro Amplifikation eines Genabschnittes ribosomaler Pilz-RNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Hybridisierung im ELISA: + Test durchgeführt
n.d. Test nicht durchgeführt

P-E-a: PCR-Ergebnis für Aspergillus : + positives Testergebnis mit cut-off
: - negatives Testergebnis
Detektionslimit : 5-10 CFU/ml Blut.

Um positive Testergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit als solche herausfiltern zu können, wird als Schwellwert hierfür der dreifache Mittelwert aller negativen Testergebnisse zu Grunde gelegt. In den folgenden Tabellen bedeutet ein Wert von 1 also, dass dieser Schwellwert erreicht wurde.
Es sei c die photometrisch errechnete Konzentration einer PCR-Probe.
Der dreifache Mittelwert, auch als Cut-off-Wert bezeichnet, errechnet sich ausschließlich unter Berücksichtigung der negativen Testergebnisse zu:
$c_{off} = 3 \times \sum c_i / N$
mit N als Anzahl dieser Testergebnisse.
Somit ergibt sich der Zahlenwert in den Tabellen zu c/c_{off}.

P-E-c: PCR-Ergebnis für Candida : + positives Testergebnis
: - negatives Testergebnis

GM: Galactomannan-Antigentest : + positives Testergebnis
: - negatives Testergebnis
: n.d. Test nicht durchgeführt
: n.k Testergebniss nicht bekannt

Aspergillose : + nachgewiesene Aspergillose
- keine Aspergillose

Pilztherapie : + Empirische antimykotische Therapie mit AmBisome
- keine empirische Therapie mit AmBisome.

Patient mit dokumentierter Aspergillose

Die Diagnose einer Aspergillose erforderte:

- den histopathologischen und kulturellen Erregernachweis aus Gewebeproben
- den Nachweis von typischen Infiltraten in CT- oder Röntgen-Thoraxaufnahmen in Kombination mit dem Nachweis des Aspergillus in der bronchoalveolären Lavage.

Tabelle 14: Patient 407 mit einer dokumentierten Aspergillose

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			n.d.	-	-
			2	+	-	-	-	-	-
			5	n.d.	-	-	n.d.	+	+
			6	+	-	-	+	+	+
			13	+	-	-	n.d.	+	+
			14	n.d.			+	+	+
			20	+	+/1.8	-	+	+	+
			28	n.d.			+	+	+
			34	+		-	n.d.	+	+
			35	n.d.			+	+	+
			36	+	+/7.9	-	n.d.	+	+
			44	n.d.			+	+	+
			47	n.d.			+	+	+
			50	+		-	-	+	+

In diesem Fall wurde die Diagnose der invasiven Aspergillose am Tag 5 nach SCT gestellt. Die PCR fiel zum ersten mal am Tag 20 positiv auf . Im Verlauf fiel die PCR ein zweites mal – am Tag 36 – positiv auf, wobei photometrisch eine höhere Pilzkonzentration festgestellt werden konnte. Eine Therapie mit

AmBisome lief seit dem Tag 5. Der Nachweis von Aspergillus-Galactomannan erfolgte am Tag 6. Der Antigentest blieb positiv bis zum Tag 47. Der Patient verstarb innerhalb des Beobachtungszeitraums, am Tag 54.

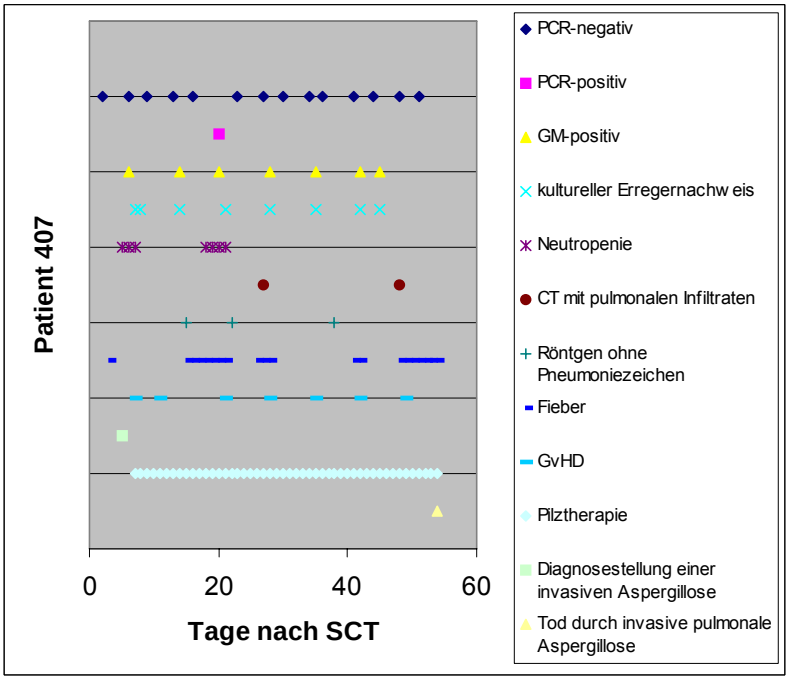


Abb. 8: Patient mit dokumentierter Aspergillose

<u>Patienten mit Verdacht auf Aspergillose</u>

Der Verdacht auf einer invasiven Pilzinfektion wurde gestellt:

- aufgrund der klinischen Symptomatik, den typischen Infiltraten in CT- und Röntgen-Thoraxaufnahmen und dem Fehlen eines positiven histopathologischen und kulturellen Erregernachweises
- infolge des Auftretens einer Sinusitis mit oder ohne mukösem Eiter/ Destruktion des angrenzenden Knochens/ dumpfem Schmerz/ Verdickung der Mukosa und des Fehlens von positiven histopathologischen und kulturellen Befunden unter Ausschluss einer bakteriellen Infektion
- aufgrund typischen Läsionen in CT und Ultraschall von Leber und Milz oder verdächtigen ophthalmoskopischen Befunden mit negativen Blutkulturen für den Fungus.

Tabelle15: Patient 291 mit Verdacht auf Aspergillose

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			n.d.	-	-
			25	n.d.			-	-	-
			26	+	+/7.8	+/3.1	-	möglich	+
			45	+		-	-	möglich	+

Bei Patient 291 wurde der klinische Verdacht auf einer Aspergillose am Tag 26 gestellt. Am gleichen Tag fiel die PCR-ELISA positiv auf mit einer hohen photometrischen Pilzkonzentration. Weitere PCR-Untersuchungen waren unter Pilztherapie negativ. Der Nachweis von Aspergillus-Galactomannan blieb während des gesamten Beobachtungszeitraums negativ.

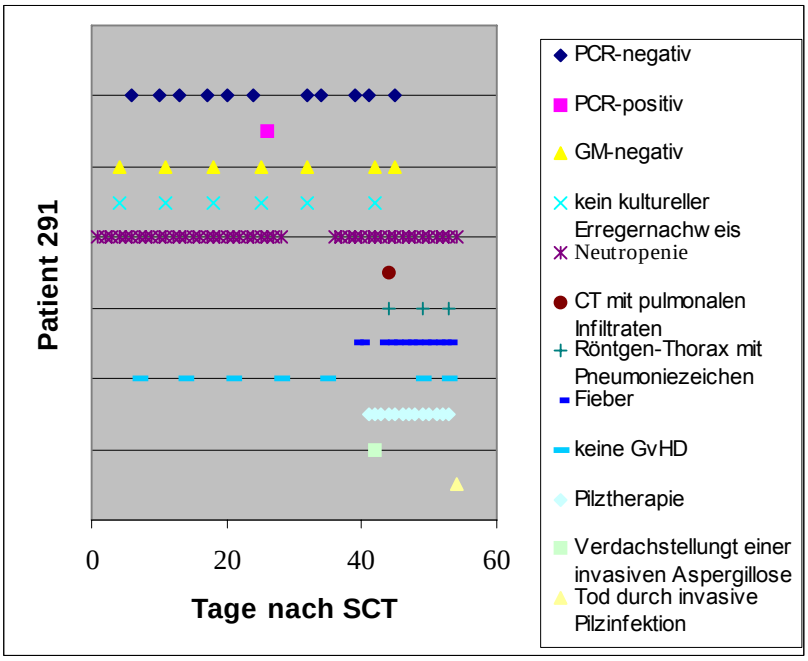


Abb. 9: Patient mit Verdacht auf Aspergillose

Tabelle 16: Patient 412 mit Verdacht auf Aspergillose

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			n.d.	-	-
			11	n.d.			n.d.	möglich	+
			14	+	-	-	n.d.	möglich	+
			15	n.d.			-	möglich	+
			29	+	+/3.4	-	-	möglich	+
			32	+	-	-	-	möglich	+
			100	+	-	-	n.d.	möglich	+

Im Falle des Patienten 412 wurde der Verdacht auf Aspergillose am Tag 11 gestellt. Aspergillus-DNA konnte erst am Tag 29 nachgewiesen werden. Die Pilztherapie lief zwischenzeitlich 19 Tage.

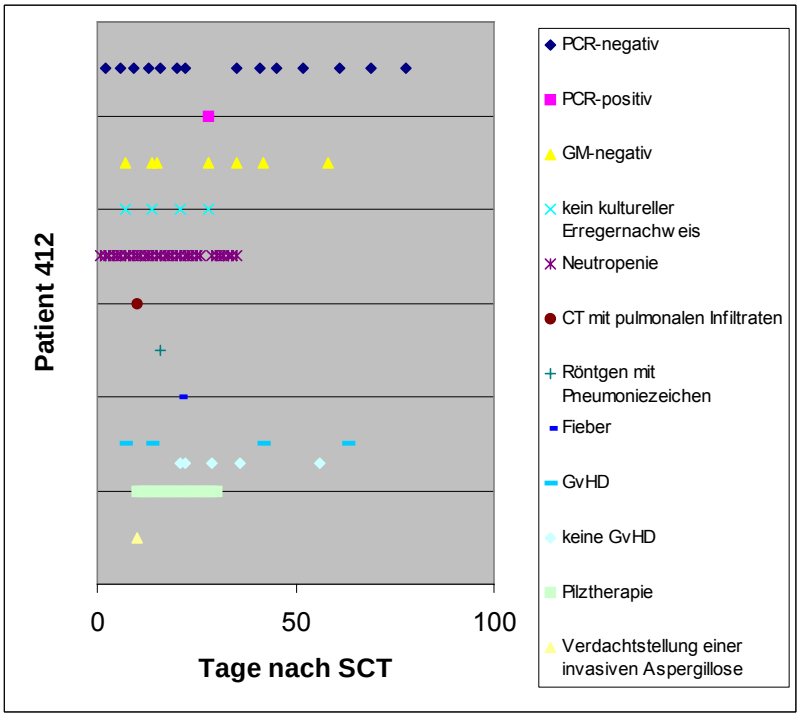


Abb. 10: Patient mit Verdacht auf Aspergillose

Tabelle 17: Patient 413 mit Verdacht auf Aspergillose

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	-			-	-	-
			13	n.d.			n.d.	möglich	+
			29	-			-	möglich	+
			35	+	+/1.5		n.d.	möglich	+
			63	-			-	möglich	+
			98	-			n.d.	möglich	+

Bei Patient 413 war sowohl die PCR als auch der Antigentest vor und kurz nach der Verdachtsstellung einer Aspergillose am Tag 13 negativ. Am Tag 35 war das PCR-Ergebnis unter AmBisome-Therapie positiv.

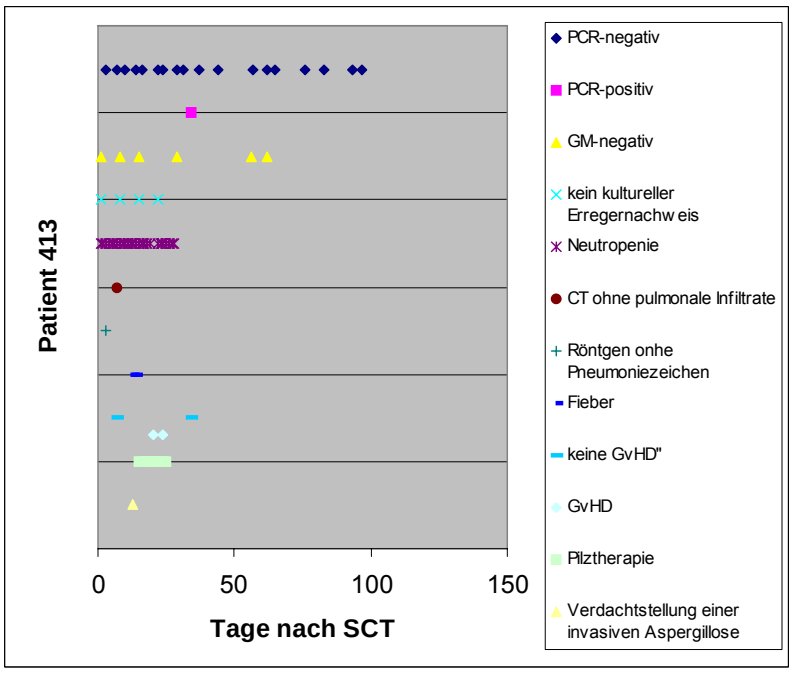


Abb. 11: Patient mit Verdacht auf Aspergillose

Tabelle 18: Patient 415 mit Verdacht auf Aspergillose

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	-		-	n.d.	-	-
			7	n.d.			-	-	-
			9	+	+/9.6	-	n.d.	-	-
			10	n.d.			n.d.	möglich	+
			16	+	+/1.2	-	n.d.	möglich	+
			20	+	+/2.1	-	-	möglich	+
			29	+	+/1.1	-	n.d.	möglich	+
			42	+	-	-	-	möglich	+
			78	+	-	-		möglich	+

Bei Patient 415 fiel die PCR am Tag 9, mit einer hohen photometrischen Pilzkonzentration, positiv auf. Ein Tag später wurde der Verdacht auf Aspergillose gestellt und mit der Pilztherapie begonnen. Am Tag 16 fiel die PCR weiterhin positiv auf. Eine positive PCR ergab sich auch an den Tagen 20 und 29. Aspergillus-Galaktomannan konnte nicht nachgewiesen werden.

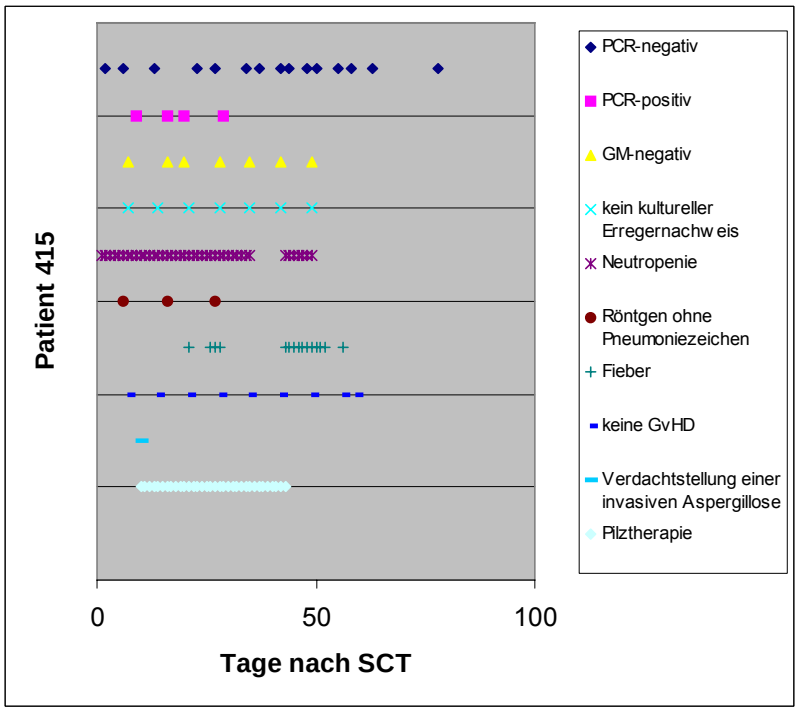


Abb. 12: Patient mit Verdacht auf Aspergillose

Tabelle 19: Patient 297 mit Verdacht auf Aspergillose

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			2	+	+/>20	-	n.d.	-	-
			9	+	-	-	n.d.	-	-
			10	n.d.			n.d.	möglich	+
			13	+	-	-	n.d.	möglich	+
			14	n.d.			-	möglich	+
			20	+	-	+/1.0	n.d.	möglich	
			38	+	-	-	-	möglich	+
			62	+	-	-	n.d.	möglich	+

Im Falle des Patienten 297 kam es gleich am Tag 2 zu einem positiven PCR-Ergebnis, mit einer sehr hohen photometrischen Pilzkonzentration. Die Verdachtsdiagnose einer Aspergillose wurde am Tag 10 gestellt und sofort mit der Therapie begonnen. Im Verlauf kam es zu keinem weiteren positiven PCR-Ergebnis. Der Antigentest blieb nach wie vor negativ.

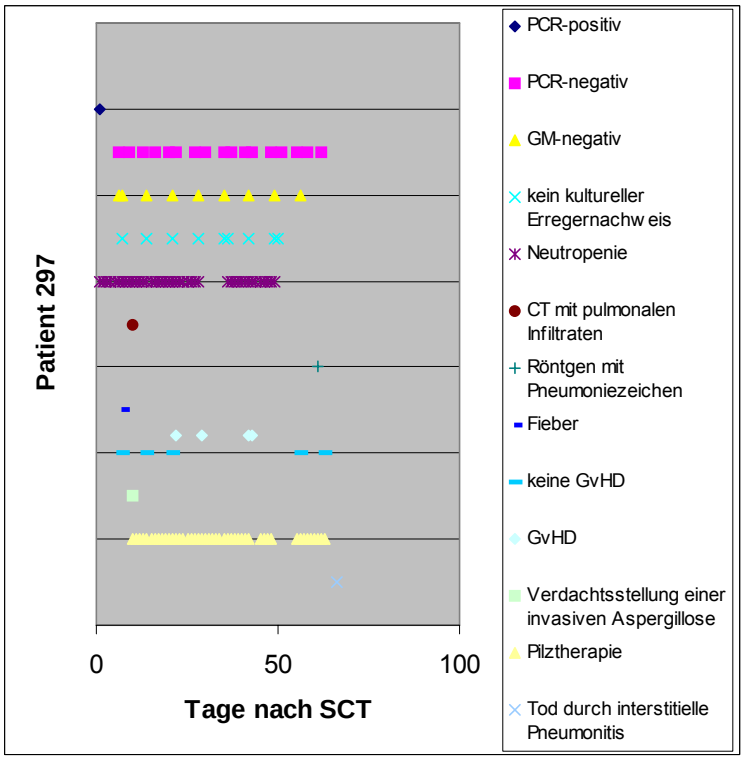


Abb. 13: Patient mit Verdacht auf Aspergillose

Tabelle 20: Patient 411 mit Verdacht auf Aspergillose

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			n.d.	-	-
			40	n.d			-	-	-
			11	+	-	+/1.8	n.d.	-	-
			21	+	-	+/1.7	n.d.	-	-
			46	+	+/1.0	-	n.d.	-	-
			82	+	-	-	-	möglich	-

Patient 411 hatte ein einziges positives Ergebnis in der PCR-ELISA am Tag 46. Der Verdacht auf eine Aspergillose wurde in der 11. Woche nach SCT gestellt. Eine Therapie mit AmBisome wurde nicht eingeführt. Der Aspergillus-Galaktomannan-Antigentest blieb negativ.

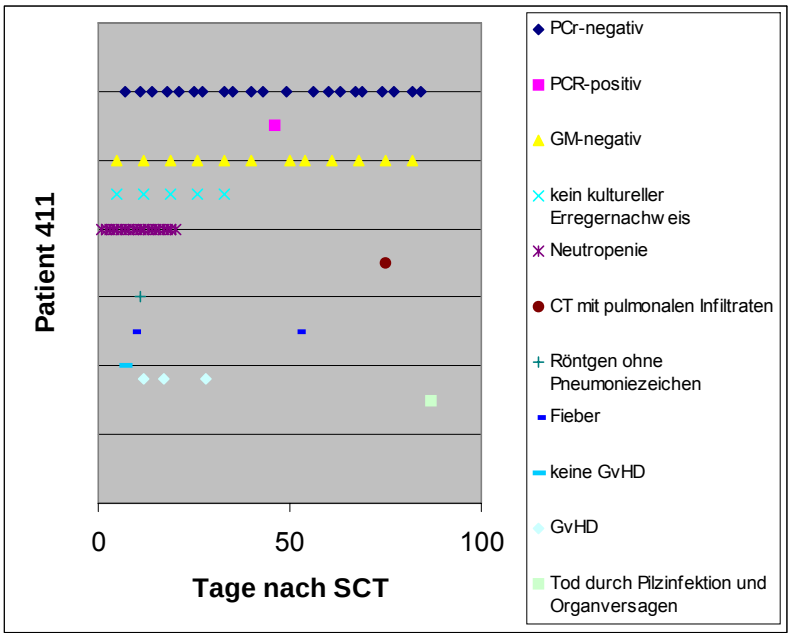


Abb. 14: Patient mit Verdacht auf Aspergillose

Patienten ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Von den 22 Patienten, die anhand des klinischen Bildes und der diagnostischen Untersuchungen keinen Anhaltspunkt für eine Aspergillose gaben, fiel bei 12 von ihnen die PCR-ELISA positiv auf.
Im Falle eines Patienten waren 4 Proben im PCR-ELISA-Verfahren positiv. Bei 5 Patienten konnten 2 Proben als positiv erwiesen werden und bei 6 Patienten war eine Probe positiv.

Tabelle 21: Patient 286 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			50	+	+/1.6	-	-	-	-
			91	+	+/3.4	-	-	-	-
			95	+	-	-	-	-	-

Bei Patient 286 war die PCR-ELISA am Tag 50 nach SCT zum ersten Mal positiv. Die am Tag 49 durchgeführte Röntgenuntersuchung des Thorax wies Pneumonie-typische Zeichen auf. Ein zweites mal fiel die PCR-ELISA am Tag 91 auf. Am Tag 92 entwickelte der Patient Fieber. Eine AmBisome-Therapie wurde vom Tag 49 bis zum Tag 69 durchgeführt.

Tabelle 22: Patient 432 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			n.d.	-	-
			21	+	+/1.4	-	n.d.	-	-
			31	+	-	-	-	-	-
			93	+	-	-	-	-	-

Patient 432 entwickelte in der Neutropenie Fieber. Die am gleichen Tag durchgeführte PCR war positiv, die Computertomographie zeigte keine pulmonale Infiltrate.

Tabelle 23: Patient 425 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			17	+	+/2.8	-	n.d.	-	-
			18	n.d.			-	-	-
			24	+	-	+/1.2	n.d.	-	-

In der Neutropenie hatte Patient 425 ein einziges für Aspergillus-DNA positives PCR-Ergebnis.

Tabelle 24: Patient 422 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			66	+	+/1.7	-	n.d.	-	-
			88	+	+/1.1	-	n.d.	-	-
			100	+	-	-	-	-	-

Patient 422 mit positiven Ergebnissen in der PCR wies keine für Aspergillose typische Symptomatik auf und die weiteren diagnostischen Verfahren gaben keinen Anhalt für eine invasive Pilzinfektion.

Tabelle 25: Patient 409 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.				-	-
			12	+	+/2.3	-		-	-
			13	n.d.				-	-
			15	+	+/6.9	-		-	-
			33	+	-	+/1.1			
			64	+	-			-	-

Patient 409 hatte in der Neutropenie zwei positive PCR-Ergebnisse für die Aspergillus-DNA.

Tabelle 26: Patient 305 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			23	+	+/2.0	-	n.d.	-	-
			27	+	+/1.5	-	-	-	-
			69	+	+/1.0	-	-	-	-
			99	+	+/1.0	-	-	-	-

Bei Patient 305 fiel die PCR zunächst am Tag 23 und anschließend am Tag 27 positiv auf. Am Tag 68 entwickelte der Patient Fieber und am Tag 69 fiel die PCR erneut positiv auf. Die PCR war ein letztes mal am Tag 99 positiv.

Tabelle 27: Patient 410 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			62	+	+/4.0	-	-	-	-
			72	+	+/1.3	-	-	-	-
			100	+	-	-	-	-	-

Patient 410 mit zwei positiven Ergebnissen in der PCR zeigte keine für Aspergillose typische Symptomatik und die weiteren diagnostischen Verfahren gaben keinen Anhalt für eine invasive Pilzinfektion.

Tabelle 28: Patient 292 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			18	+	+/1.2	-	-	-	-
			39	+	+/>20	-	-	-	-
			46	+	-	-	-	-	-

Trotz zwei positiven Ergebnissen in der PCR bei Patient 292 gaben Symptomatik und diagnostische Verfahren keinen Anhalt für eine invasive Pilzinfektion.

Tabelle 29: Patient 426 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			2	+	-	-	-	-	-
			27	+	+/1.0	-	-	-	-

Am Tag 23 entwickelte Patient 426 in der Neutropenie Fieber. Das Fieber hielt bis zum Tag 26 an und am Tag 27 fiel die PCR für Aspergillus-DNA positiv auf.

Tabelle 30: Patient 401 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			6	+	+/1.1	-	-	-	-
			58	+	+	+	-	-	-
			79	+	+	+	-	-	-
			100	+	+	-	-	-	-

Patient 401 hatte mehrere positive Ergebnisse in der PCR. Allerdings entwickelte er keine für eine Aspergillose typische Symptomatik und eine endgültige Diagnose für eine Pilzinfektion blieb aus.

Tabelle 31: Patient 295 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d			-	-	-
			5	+	+/1.9	-	n.d	-	-
			7	+	-	-	-	-	-
			99	+	-	-	-	-	-

In der Neutropenie hatte Patient 295 ein einziges positives PCR-Ergebnis.

Tabelle 32: Patient 308 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			1	+	-	-	-	-	-
			8	+	-	-	-	-	+
			31	+	+/4.9	-	-	-	-
			99	+		-	-	-	-

Bei Patient 308 mit einem positiven Ergebnis in der PCR konnte keine invasive Pilzinfektion nachgewiesen werden.

Patienten ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Bei 10 Patienten konnte in der PCR-Analyse keine Aspergillus-DNA nachgewiesen werden. Der Antigentest für Aspergillus-Galactomannan ließ sich in einem Fall als positiv erweisen.

Tabelle 33: Patient 424 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	+	-	-	n.d.	-	-
			3	+	-	-	n.d.	-	-
			10	+	-	-	-	-	+

Patient 424 entwickelte am Tag 10 in der Neutropenie Fieber und erhielt AmBisome bis zum Tag 14. An den Tagen 12 und 13 nach SCT traten in CT bzw. in der Röntgen-Thoraxaufnahme pulmonale Infiltrate auf. In der PCR konnte keine Aspergillus-DNA nachgewiesen werden.

Tabelle 34: Patient 431 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			9	+	-	-	-	-	-
			20	+	-	+/1.2	n.d		
			83	+	-	-	n.d.	-	-

Tabelle 35: Patient 449 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			-	-	-
			2	+	-	-	n.d.	-	-
			30	+	-	+/1.7	n.d.	-	-

Tabelle 36: Patient 296 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-C	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			n.d.	-	-
			12	+	-	-	-	-	-

Tabelle 37: Patient 301 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.				-	-
				+	-	-		-	-

Tabelle 38: Patient 310 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	n.d.			n.d.	-	-
			61	+	-	-	-	-	-

Tabelle 39: Patient 309 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	+	-	-	n.k.	-	+
			7	+	-	-	n.k.	-	+
			14	+	-	-	n.k.	-	+
			18	+	-	-	n.k.	-	-

Patient 309 hatte 2 febrile Episoden und erhielt eine AmBisome-Therapie. Dabei blieb die PCR für Aspergillus-DNA negativ.

Tabelle 40: Patient 438 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	+	-	-	n.d.	-	-
			3	+	-	-	n.d.	-	-
			4	n.d.			+	-	-
			10	+	-	-	-	-	-
			28	+	-	+/1,3	n.d	-	-

Tabelle 41: Patient 424 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	+	-	-	n.d.	-	-
			3	+	-	-	n.d.	-	-
			10	+	-	-	-	-	+

Tabelle 42: Patient 421 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	+	-	-	n.k.	-	-
			57	+	-	-	n.k.	-	+

Patient 421 entwickelte in der Neutropenie Fieber und erhielt eine AmBisome-Therapie.

Tabelle 43: Patient 416 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis

Pat	Alter	Diagn	Tag	PCR	P-E-a	P-E-c	GM	Aspergillose	Pilztherapie
			0	+	-	-	n.k.	-	-
			100	+	-	-	n.k.	-	-

Sensitivität und Spezifität der PCR-ELISA.

Tabelle 44: PCR +: positives PCR-Ergebnis, **PCR -** : negatives PCR-Ergebnis, **IA**: dokumentierte invasive Aspergillose, **möglich**: Verdacht auf Aspergillose, **keine IA**: keine nachgewiesene Aspergillose

Patientenzahl	**IA**	**möglich**	**keine IA**	**Gesamt**
PCR +	1	6	12	19
PCR -	0	0	10	10
Gesamt	1	6	22	29

Tabelle 45: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert **PPV**: positiver prädiktiver Wert, **NPV**: negativer prädiktiver Wert

	IA	**möglich**
Sensitivität	100%	100%
Spezifität	35,7%	45,5%
PPV	5,3%	33%
NPV	100%	100%

3.2 Light-Cycler

Die insgesamt 31 Proben, bei denen die Aspergillus-DNA in der PCR-ELISA nachgewiesen werden konnte, wurden weiter im Light-Cycler-System auf die Pilz-DNA untersucht.
Von den 31 Proben waren in diesem zweiten Verfahren 3 positiv und 28 negativ.

Tabelle 46: Patienten mit positivem Ergebnis im Light-Cycler-System

Pat	Alter	Diagnose	Tag	Light-Cycler	P-E	Aspergillose
415	29	AML	9	+	9.6	möglich
297	41	ALL	2	+	>20	möglich
292	7	Rhabd	39	+	>20	keine

Patient 415 hatte in der PCR-ELISA vier positive Resultate. Im Light-Cycler dagegen nur ein positives Ergebnis. Positiv für Aspergillus-DNA fiel in diesem Nachweisverfahren die Probe auf, die am Tag 9 nach SCT abgenommen wurde. Diese zeigte in der PCR-ELISA, im Vergleich zu den übrigen 3 Proben, die höchste photometrische Pilzkonzentration. Im Light-Cycler erreichte die Konzentration der Zielsequenz auch einen hohen Wert. Der klinische Verdacht auf eine Aspergillose wurde am Tag 10 nach SCT gestellt.
Bei Patient 297 gab es, genau wie in der PCR-ELISA, auch im Light-Cycler nur ein positives Resultat. Aspergillus-DNA konnte schon am Tag 2 nach SCT nachgewiesen werden und wie im vorigen Fall, wurde auch hier photometrisch in der ELISA eine hohe Pilzkonzentration gemessen. Im Light-Cycler wurde ebenfalls eine hohe Konzentration der Zielsequenz gemessen. Der klinische Verdacht auf Aspergillose wurde am Tag 10 nach SCT gestellt.
Im Falle des Patienten 292 konnte in der PCR-ELISA am Tag 18 und 39 die Aspergillus-DNA nachgewiesen werden. Im Light-Cycler war der DNA-Nachweis nur am Tag 39 möglich. Und wiederum handelte es sich um eine Probe mit einer hohen photometrischen Pilzkonzentration in der PCR-ELISA. Es konnte keine Aspergillose nachgewiesen werden.

3.3 DNA Detection Test Strips

Die 31 Proben mit positivem Ergebnis für Aspergillus-DNA in der PCR-ELISA, wurden weiter mit den Test-Strips von Roche aufgearbeitet.

6 von den 31 Proben fielen in diesem dritten Nachweisverfahren positiv für Aspergillus-DNA auf.

Tabelle 47: Patienten mit positivem Nachweis von Aspergillus-DNA bei den Test-Strips

Pat	Alter	Diagnose	Tag	P-E-a	Test-Strips	Aspergillose	Pilztherapie
407	29	ALL	20	1.8	+	+	+
415	29	AML	9	9.6	+	möglich	-
415			16	2.1	+	möglich	+
415			29	1.1	+	möglich	+
292	7	Rhabdom	39	>20	+	-	-
401	10	ALL	6	1.1	+	-	-

Bei dem Patienten mit dokumentierter Aspergillose, sowie bei einem aus den insgesamt 5 Patienten mit Verdacht auf Aspergillose konnte mit den Test-Strips die Aspergillus-DNA nachgewiesen werden. Zu einem positiven Ergebnis kam es auch bei 2 Patienten, bei denen keine Pilz-DNA nachgewiesen werden konnte.

Obwohl dieses Testverfahren ohne großen Aufwand den schnellen Nachweis von Aspergillus-DNA erlaubte, entsprach es, im Bezug auf Sensitivität und Spezifität, nicht dem Standard. Aus diesem Grund wurde die Produktion der Test-Strips eingestellt.

4. Diskussion

Aspergillen stehen zusammen mit Candida-Arten und Cryptococcus neoformans als opportunistischer Infektionserreger bei Patienten mit malignen Grunderkrankungen im Vordergrund.

Trotz den signifikanten Fortschritten in der Diagnose und Therapie von Aspergillus-Infektionen steigt ihre Inzidenz weiter an und die Mortalität bleibt nach wie vor hoch, in manchen Fällen bis zu 30-50%. Dieses Phänomen kann zum Teil auf die technische und medikamentöse Entwicklung in der Medizin zurückgeführt werden, vor allem auf die intensivierten chemotherapeutischen Behandlungen mit langanhaltender Granulozytopenie, die Einführung der CD34-Selektion, die Erhöhung der Amphotericin-B-Resistenzrate oder die zunehmende Zahl der allogenen KMT mit akuten Graft-vs.-Host-Reaktionen (GvHD).

Für die Diagnose von Aspergillus-Arten stehen verschiedene labordiagnostische Untersuchungen zur Verfügung. Bis jetzt erfordert die definitive Diagnose einer manifesten Infektion den mikroskopischen und kulturellen Nachweis aus Gewebeproben. Während die diagnostische Wertigkeit von Aspergillus-Antikörper-Nachweis durch seine geringe Sensitivität und Spezifität eingeschränkt ist, weisen verschiedene Studien auf die diagnostische Wertigkeit der Untersuchung von Aspergillus-Galactomannan in Sandwich ELISA hin [57,58,59]. Eine besondere Herausforderung und viel versprechend ist der Einsatz der PCR für den schnellen und gezielten Nachweis von Aspergillus-DNA aus unterschiedlichem Untersuchungsmaterial.

Momentan stellen Fluconazol und konventionelles Amphotericin B die Standardtherapie von Pilzinfektionen bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen dar. Während Fluconazol durch eine zunehmende Resistenzentwicklung, die seinen prophylaktischen Einsatz einschränkt, gekennzeichnet ist, ist konventionelles Amphotericin B durch eine hohe Nebenwirkungsrate charakterisiert. Es wurde in einer 12-wöchigen Studie eine therapeutische Überlegenheit von Voriconazol gegenüber konventionellem Amphotericin B beschrieben [54]. Die Voriconazol-Gruppe zeigte ein positives Outcome bei 52,8% der Patienten im Vergleich zu 31,6% der Amphotericin B-

Gruppe. Beim Einsatz von liposomalem Amphotericin B wird eine gute Wirksamkeit bei gleichzeitig deutlich reduziertem Nebenwirkungsspektrum beobachtet [60].
Im Rahmen dieser Arbeit wurden retrospektiv Blutproben von 29 Patienten bis zum Tag 100 nach KMT in dem PCR-ELISA auf Aspergillus-DNA untersucht und mit zwei weiteren Nachweisverfahren, nämlich dem Light-Cycler-System und den sogenannten Aspergillus-DNA-Detection-Strips verglichen.

4.1 PCR

4.1.1 PCR im Blut

Für den Nachweis von Aspergillus-DNA wurde die PCR an EDTA-antikoagulierten Blutproben durchgeführt. Viele Studien haben die diagnostische Wertigkeit der PCR im Serum oder im Blut für den Nachweis von Aspergillus-Infektionen gezeigt. Im Serum wurde allgemein eine Sensitivität von 55-70% und ein negativer prädiktiver Wert von 23-53% beschrieben, während im Vollblut eine Sensitivität und ein negativer prädiktiver Wert von 100% dokumentiert wurde [47,49]. Im Blut können Pilzzellen mit Erythrozyten präzipitieren. Dabei bietet die Extraktion von Aspergillus-DNA aus Vollblut den Vorteil, dass auch diese präzipitierten Zellen später in der PCR erfasst werden können und nicht verloren gehen. Dies erklärt auch das seltene Auftreten von falsch-negativen Ergebnissen in der PCR, die mit Vollblutproben durchgeführt wird. Ferns et al kommentieren in ihrer Arbeit, dass es noch nicht klar ist, wo genau im Blut die Aspergillus-Infektion lokalisiert ist und es deshalb sinnvoller ist, Vollblut als Untersuchungsmaterial einzusetzen [61].
Das für die Extraktion benötigte Volumen betrug 5ml, wobei sich wahrscheinlich mit steigender Volumenmenge auch die Sensitivität der PCR steigt [61].

4.1.2 Amplifikation einer bestimmten Genregion

Im Prinzip eignet sich eine ganze Reihe von Nukleotidsequenzen für den Nachweis von Pilzen. Es sind vor allem ribosomale und mitochondriale Nukleinsäuren, die häufig in der PCR Anwendung finden. In dieser Arbeit wurde

eine PCR mit universellen Primers durchgeführt, die die Amplifikation einer Zielsequenz in der 18s rRNA Genregion erlauben. Innerhalb der 18s rRNA lassen sich hochkonservierte und variable Bereiche unterscheiden, die bei den meisten klinisch relevanten Pilz-Arten zu finden sind. Fern et al ziehen die Amplifikation einer kleinen mitochondrialen Zielregion vor, spezifisch für Aspergillus-Spezies, wodurch Kreuzreaktionen mit anderen Pilzen oder mit Human-DNA vermieden werden können [46].

4.1.3 Rolle der PCR in der Diagnostik

Aspergillus-Infektionen und vor allem ihrer invasiven Form sind schwer zu diagnostizieren. Nicht spezifische Symptome, relativ niedrige Spezifität und Sensitivität der konventionellen mikrobiologischen Methoden tragen dazu bei [62]. Eine Frühdiagnose von solchen Infektionen ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie.

PCR stellt ein einfaches, nicht-invasives und reproduktives Testverfahren dar.

Es gibt aber zwei potenziell wichtige Probleme bei der Interpretation der PCR-Ergebnisse. Erstens die Signifikanz einzelner positiver Ergebnisse und zweitens das Phänomen, dass manche Patienten-Proben nur intermittierend in der PCR positive Ergebnisse ergaben [63].

Es wurde bei verschiedenen Studien beobachtet, dass in der PCR die Aspergillus-DNA oft nicht kontinuierlich nachgewiesen werden konnte. Es gab Zeitintervalle, bei denen die PCR negativ war, bevor der Test wieder positiv auffiel. Auch in dieser Arbeit war die PCR während des gesamten Beobachtungszeitraums nur intermittierend positiv.

Ansorg et al erklären die intermittierende Fungämia durch hepatische Clearance der Pilzelemente [64]. Duthie & Denning unterstreichen, dass eine Fungämia nur selten vorkommt [74]. Breatgne et al machen aufmerksam auf die kurze Halbwertszeit von zirkulierender DNA (<5min) und liefern auf diese Weise eine weitere mögliche Erklärung für die intermittierend auftretenden positiven PCR-Ergebnisse [12].

Noch unklar ist, inwieweit einzelne positive Episoden in der PCR klinisch relevant sind. Sie können Ausdruck einer subklinischen Aspergillose sein, das

Ergebnis von Makrophagen freigesetzter DNA messbar in der PCR- oder die Folge einer Pilzkolonisation [65]. Lass-Flörl et al beschrieben 1999, dass es bei 60% ihrer Patienten den Beweis für eine pulmonale Pilzkolonisation gab ohne die klinischen Symptome einer Pilzinfektion [66]. Das PCR-Verfahren kann nicht unterscheiden zwischen einer sporadischen exogenen Kontamination der Proben von einer tatsächlichen und trotzdem intermittierend auftretenden Aspergillämia. Pilze sind in der Natur ubiquitär verbreitet, so dass im Falle einer PCR mit universellen Primer eine exogene Kontamination nicht ausgeschlossen werden kann [62,66]. Der Einsatz von spezifischen Primer, die Durchführung der PCR unter Sterilbänken, die Verwendung von geeigneten positiven und negativen Kontrollen und die Durchführung der DNA-Extraktion und der PCR in getrennten Räumen sollen das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen erheblich reduzieren [67].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 21 Blutproben von 13 Patienten ohne nachgewiesene Aspergillose in der PCR-ELISA positiv getestet.

4.1.4 Therapieeinsatz und -überwachung durch die PCR

Angesichts der hohen Raten von Morbidität und Mortalität bei onkologischen Patienten in der Neutropenie und nach SCT, für die zu einem großen Teil invasive Pilzinfektionen verantwortlich sind, wurde die empirische antimykotische Therapie zur Standardtherapie bei neutropenischem Fieber, das auf Breitspektrumantibiotika nicht anspricht.

Auf der Suche nach diagnostischen Verfahren, die die Identifikation von Hochrisiko-Patienten und den rechtzeitigen Einsatz einer antimykotischen Therapie erlauben, führten Hebart et al 2000 eine PCR bei Patienten während neutropenischen, febrilen Episoden durch [48]. Der positive prädiktive Wert der PCR während dieser Episoden betrug 36,8%. Außerdem wurde eine Korrelation beschrieben zwischen Befreiung des Blutes von Pilz-DNA und Zurücktreten der klinischen Symptomatik. Patienten mit verheerenden invasiven Pilzinfektionen zeigten einen persistierenden Nachweis von Pilz-DNA im Blut trotz antimykotischer Therapie [48]. In dieser Arbeit fiel der Patient mit dokumentierter Aspergillose in der PCR zum ersten Mal am Tag 20 und

anschließend am Tag 36 nach SCT positiv auf. Die Therapie lief inzwischen seit 16 Tagen. Bei 4 von den insgesamt 5 Patienten mit Verdacht auf Aspergillose fiel die PCR einmal positiv auf. Bei 2 von diesen 4 Patienten konnte die Pilz-DNA unter Therapie nachgewiesen werden. Bei den anderen zwei Patienten war die PCR positiv vor Therapie-Beginn mit höheren photometrischen Konzentrationen in dem PCR-ELISA. Nur bei einem Patienten mit Verdacht auf Aspergillose konnte die Aspergillus-DNA viermal nachgewiesen werden. Einmal vor Therapiebeginn und dreimal unter Therapie, wobei vor Therapie eine höhere Pilz-Konzentration photometrisch gemessen werden konnte. In diesen Fällen scheint die antimykotische Therapie den Nachweis von DNA negativ zu beeinflussen. Die prophylaktische Gabe von antimykotischer Therapie kann also die Rolle von PCR als Screening-Methode einschränken. Von manchen Autoren wird die antimykotische Therapie teilweise für die Befreiung des Blutes von Pilz-DNA gemacht, während die Lungen, wie es sich später autoptisch bestätigt hat, nicht komplett pilzfrei waren [65]. Deventer et al zeigten, dass die positiven PCR-Ergebnisse von Candida albicans-DNA im Blut sich nicht von der antimykotischen Therapie beeinflussen ließen [71].

4.2 Aspergilllus-Diagnostik

4.2.1 Radiologie

Hämatologische und onkologische Patienten sind einem höherem Risiko für pulmonale Komplikationen ausgesetzt und die meisten von ihnen weisen keine spezifischen radiologischen Zeichen auf.

Die Computertomographie und besonders die Dünnschicht-CT (HRCT, high resolution CT) spielt eine zunehmend wichtigere Rolle in der Diagnose von Aspergillus-Infektionen [75]. Im HRCT können pulmonale Abnormalitäten dargestellt werden, auch wenn die konventionellen Röntgen-Thoraxaufnahmen keinen abnormen Befund zeigen. Besonders in den Frühstadien einer Aspergillus-Infektion ist HRCT sensitiver und spezifischer als die konventionellen Röntgen-Thoraxaufnahmen. Zwei CT-Zeichen haben sich inzwischen als hinweisend für eine invasive pulmonale Aspergillose erwiesen.

Der Halo-Effekt stellt eine hämorrhagische Infarzierung um den Infektionsherd herum dar und ist charakteristisch für die angioinvasive Form der Aspergillose [76]. Er erlaubt die Annahme einer Aspergillose vor dem typischen Auftreten der Cavitation. Der Halo-Effekt tritt nur kurzfristig zu Beginn der Krankheit und während der neutropenischen Periode auf. Annähernd ¾ der Halo-Effekte, die initial im CT zu sehen sind, verschwinden innerhalb der ersten Woche nach Diagnosestellung. Damit kann die frühzeitige Durchführung von CT bei der Diagnose einer invasiven Aspergillose sehr hilfreich sein. Auf der anderen Seite spricht das „air-crescent“ Zeichen eher für eine pulmonale Cavitation. Dies ist eigentlich für eine invasive Aspergillose nicht pathognomonisch. Sein Nachweis aber bei Patienten mit malignen Erkrankungen ist für eine Pilzinfektion hinweisend. „air-crescent“ Zeichen ist später als der Halo-Effekt im CT zu sehen und sein Auftreten korreliert oft mit der KM-Regeneration [68]. Angesichts der Vorteile, die die Computertomographie bietet, kann diese in Kombination mit Röntgen, das immer noch das Standardverfahren in diesen Fällen darstellt, erfolgreich zu Diagnose und Verlauf von pulmonalen Komplikationen bei Patienten nach SCT eingesetzt werden.

4.2.2 Labordiagnostik

Als zuverlässiges Untersuchungsmaterial zur Diagnose von Aspergillus-Infektionen sind Proben von physiologischerweise sterilen Arealen, d.h. Blut, Biopsien, Punktate oder Liquor cerebrospinallis zu verwenden. Respiratorische Sekrete, BAL, Schleimhautabstriche, Stuhl oder Urin lassen auch bei quantitativer Bestimmung der Pilzzellen keine Unterscheidung zwischen Kolonisation und manifester Infektion zu. Ihr Einsatz als Untersuchungsmaterial unterstützt die Diagnose einer Aspergillus-Infektion, ist aber für eine solche Erkrankung nicht beweisend.

Kultureller Erregernachweis ist durch niedrige Sensitivität charakterisiert. Wichtig ist hier immer die Frage, ob es sich um einen ätiologisch relevanten Krankheitserreger handelt, um eine Kontamination oder um eine Kolonisation.

Als Standardverfahren in der Diagnose von invasiven Pilzinfektionen gilt, neben kulturellen Nachweisverfahren, der mikroskopische und histopathologische

Erregernachweis, wobei letzterer durch prolongierte Neutropenie limitiert wird.
Die serologische Diagnose von Aspergillus-Infektionen basiert auf dem Nachweis von zirkulierenden Antigenen. Bei invasiver Aspergillose kann als zirkulierendes Antigen u.a. das Zellwandpolysaccharid Galactomannan nachgewiesen werden.
Der Latex-Agglutinationstest ist eine allgemein verfügbare Nachweismethode und bei Patienten mit erhöhtem Risiko für eine invasive Aspergillose sinnvoll. Der Test ist durch eine geringe Sensitivität (ca. 50%) gekennzeichnet und liefert demzufolge positive Ergebnisse erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Seine Spezifität beträgt 60-100% und ist auf falsch positive Reaktionen mit anderen Pilzen zurückzuführen. Als zuverlässiges Nachweisverfahren zur Detektion von Aspergillus-GM führten Stynen et al das Sandwich-ELISA ein. In diesem Verfahren werden monoklonale Antikörper von der Ratte eingesetzt, die für die 1,5-ß-D-Galactofurosid-Seitenkette des Aspergillus-GM spezifisch sind. Das Detektionslimit dieser Methode im Serum liegt bei etwa 1,0ng/ml, während beim älterem Latex-Agglutinationstest das Detektionslimit bei etwa 15ng/ml eingeschätzt wird [37]. Maertans et al versuchten zum ersten mal in einer prospektiven Studie die diagnostische Wertigkeit und Präzision vom GM-ELISA-Test nachzuweisen [59]. Es wurde über eine Sensitivität von 91% und wenigen falsch-negativen Ergebnissen berichtet, wobei hier erwähnt werden muss, dass die hohe Sensitivitätsrate auch an der großen Probenanzahl für Patienten mit nachgewiesener Aspergillose und mit Verdacht auf einer Aspergillus-Infektion liegen kann. In einer Studie von Pinel et al ergab der serologische Nachweis von Aspergillusantigen eine Spezifität von 99,6% und eine Sensitivität von nur 50% [77]. Herbrecht et al berichten für das gleiche Nachweisverfahren über eine Sensitivität von 64,5% bei Patienten mit dokumentierter Aspergillose, aber nur über eine Sensitivität von 16,4% bei Patienten mit einem Verdacht auf eine invasive Aspergillus-Infektion [78].
Oft wurde in verschiedenen Studien die Sensitivität von PCR und GM-Antigentest verglichen. Becker et al behaupten in ihrer Studie, dass der Aspergillus-GM-Antigentest sensitiver als die PCR sei. Die Autoren berichten, in

einem tierexperimentellen Modell, über eine Sensitivität des GM-Antigentests von 100% gegenüber 41% der PCR, wobei hier erwähnt werden muss, dass das für die PCR eingesetzte Volumen nur 0,5ml betrug. Sie betonen, dass der Antigentest früher positiv auffiel als die PCR und dass letztere nur intermittierend positiv war [58]. Zum gleichen Ergebnis kamen 1998 Bretagne et al [79]. Hashimoto et al unterstützen in ihrer Studie die Überlegenheit von PCR als diagnostisches Verfahren gegenüber dem GM-Antigentest [80]. Yamakami et al berichten in ihrer Studie 1996 über eine Sensitivität von 71% für die PCR und 60% für den Antigentest. In diesem Fall wurden die Testverfahren in Serumproben von Patienten mit invasiver Aspergillose durchgeführt [45]. 2004 beschrieben Buchheidt et al eine Sensitivität von 63,6% für PCR und 33,3% für GM-Antigentest [81].

4.3 Das Light-Cycler-System

Das Light-Cycler-System ist praktisch ein quantitatives PCR-Verfahren, das ohne großen Aufwand schnell die Amplifikation und Detektion von Pilz-DNA erlaubt. 31 Proben von insgesamt 19 Patienten, die in der PCR-ELISA positive Resultate ergaben, wurden im Light-Cycler quantifiziert. Von diesen 31 PCR-positiven Proben waren 3 (10%) auch im Light-Cycler-System positiv und 28 (90%) negativ. Das Light-Cycler-System konnte keine Aspergillus-DNA nachweisen beim Patienten mit dokumentierter Aspergillose. 2 Proben aus 2 Patienten mit dem Verdacht auf eine Aspergillose waren im Light-Cycler positiv. Ein Patient ohne nachgewiesene Aspergillose fiel ebenfalls in diesem Testverfahren positiv auf. Light-Cycler wurde erfolgreich zur Diagnose von Infektionen eingesetzt, deren Erreger kulturell schwer nachzuweisen sind. Die Sensitivität ist im Light-Cycler-System niedriger als diejenige im PCR-ELISA und deshalb ist Light-Cycler weniger geeignet als frühdiagnostisches Verfahren. Auf der anderen Seite könnte Light-Cycler wertvoll bei der Quantifikation von klinischen Proben sein. Momentan erlaubt die Quantifikation der Proben nicht den Unterschied zwischen den verschiedenen klinischen Kategorien [50].

5. Zusammenfassung

Invasive Pilzinfektionen, v.a. invasive Infektionen mit Aspergillus, sind zu einem großen Teil mit einer hoher Rate an Morbidität und Mortalität verbunden. Besonders gefährdet sind immunsupprimierte Patienten nach Hochdosis Chemotherapie und nach Knochenmarktransplantation.

Die definitive Diagnose einer Aspergillose erfordert den zyto- oder histopathologischen Nachweis von Hyphen, sowie den kulturellen Erregernachweis, was allerdings selten gelingt.

Zur Diagnose solcher Infektionen werden immer häufiger nicht invasive Methoden eingesetzt. Viele Studien haben die diagnostische Wertigkeit der PCR beschrieben. Die alleinige Durchführung einer Aspergillus-PCR aus Vollblutproben zum Nachweis einer Aspergillus-Infektion ist nicht möglich. PCR-positive Ergebnisse können aber zusammen mit anderen diagnostischen Verfahren dazu beitragen, Hochrisiko-Patienten rechtzeitig zu erkennen und erfolgreich zu therapieren. Wichtig dabei ist die richtige Interpretation von solchen positiven Ergebnissen. Ein einziges PCR-positives Resultat ist nicht aussagekräftig. Außerdem können ein oder mehrere PCR-negative Ergebnisse eine invasive Aspergillose nicht definitiv ausschließen. Auf der anderen Seite wurde eine hohe Spezifitätsrate der PCR beschrieben, wenn die Patienten mehrere positive PCR-Resultate haben.

Neben der schnellen und zuverlässigen Diagnose von Pilzinfektionen, hat die Quantifikation von Pilz-DNA einen besonders wichtigen Stellenwert. Das Light-Cycler-System kombiniert die schnelle in vitro Amplifikation mit dem direkten Fluoreszenz-Nachweis der Amplifikaten. Dies ermöglicht die Quantifikation von DNA und erlaubt Rückschlüsse auf das Ansprechen der jeweiligen Therapie.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Methoden zum Nachweis von Aspergillus-DNA im Blut von immunsupprimierten Patienten mit empirischer AmBisome-Therapie verglichen. Hierfür wurden insgesamt 507 Blutproben von 29 Patienten in der PCR analysiert, anschließend im Light-Cycler-System quantitativ ausgewertet und schließlich mit den sogenannten DNA-Detections-Strips untersucht.

Beim Patienten 407 mit dokumentierter Aspergillose konnte diese histopathologisch und kulturell in der PCR, durch den Aspergillus-Galactomannan-Antigentest sowie durch die DNA-Detections-Strips nachgewiesen werden. Aspergillus wurde zum ersten mal am Tag 5 nach SCT mikroskopisch und kulturell detektiert. Am Tag 6 fiel der Antigentest positiv auf. Am Tag 20 konnte der Fungus auch in der PCR-ELISA und mit den Test-Strips nachgewiesen werden.

Beim Patienten 291 mit bestehendem Verdacht auf Aspergillose konnte der Erreger zum ersten mal am Tag 26 in der PCR nachgewiesen werden. Der Aspergillus-Galactomannan-Antigentest blieb negativ, die mikroskopische und kulturelle Untersuchung, das Light-Cycler-System und die Test-Strips ergaben kein positives Ergebnis.

Beim Patienten 412, ebenfalls mit Verdacht auf Aspergillose, fiel die PCR am Tag 29 positiv auf. Der Antigen-Test, die histopathologische und kulturelle Untersuchung, das Light-Cycler-System und die Test-Strips blieben negativ.

Beim Patienten 413, mit Verdacht auf Aspergillose seit Tag 13, war die PCR erst am Tag 35 positiv. Der Antigen-Test, die histopathologische und kulturelle Untersuchung, das Light-Cycler-System und die Test-Strips blieben negativ.

Beim Patienten 415 konnte Aspergillus zum ersten mal am Tag 9 nach SCT in der PCR, im Light-Cycler-System und mit den Test-Strips nachgewiesen werden. Der Verdacht auf Aspergillose wurde am Tag 10 gestellt. Der Antigen-Test und die histopathologische Untersuchung blieben negativ.

Beim Patienten 297 konnte am Tag 2 zum ersten mal der Erreger in der PCR, im Light-Cycler-System und mit den Test-Strips nachgewiesen werden. Die mikroskopische und kulturelle Untersuchung auf Aspergillus, sowie der Antigen-Test waren negativ.

Bei Patient 411 war die PCR ein einziges Mal am Tag 46 positiv. Der Verdacht auf eine invasive Aspergillose wurde am Tag 77 gestellt. Die mikroskopische und kulturelle Untersuchung auf Aspergillus sowie der Antigen-Test waren negativ.

Von den insgesamt 12 Patienten mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis und ohne nachgewiesene Aspergillose konnte bei einem Patienten im Light-Cycler-

System und mit den Test-Strips Aspergillus-DNA detektiert werden. Bei einem weiteren Patienten aus der gleichen Gruppe konnte die Pilz-DNA auch mit den Test-Strips nachgewiesen werden.

Das PCR-Verfahren ist durch eine hohe diagnostische Sensitivität (100%) und eine geringe Spezifität (35,7-45,5%) charakterisiert. Der prognostische Wert der positiven PCR-Proben war mit 5,3% für eine nachgewiesene invasive Aspergillose und 33% für eine mögliche Aspergillus-Infektion gering. Der negative Vorhersagewert dagegen betrug in beiden Fällen 100%. Damit erwies sich das PCR-Verfahren im Rahmen der vorliegenden Arbeit gegenüber dem Light-Cycler-System als deutlich zuverlässiger.

6. Literaturverzeichnis

1. Denning DW: Invasive Aspergillosis. Clinical Infectious Diseases 1998;26:781-805.

2. Warris A, Klaassen CH, Meis JF, De Ruiter MT, De Valk HA, Abrahamsen TG, Gaustad P, Verweij PE: Molekular epidemiology of Aspergillus fumigatus isolates recovered from water, air and patients shows two clusters of genetically distinct strains. J Clin Microbiol. 2003 Sep; 41(9): 4101-6.

3. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K: Trends in the post mortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. J Infect. 1996 Jul;33 (1): 23-32.

4. Latgé JP: Aspergillus fumigatus and Aspergillosis. Clinical Microbiology Reviews. Apr,1999.p.310-350.

5. Kontoyannis DP, Bodey GP: Invasive Aspergillosis in 2002: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002 Mar; 21(3): 161-72.

6. Cornet M, Fleury L, Maslo C, Bernard JF, Brucker G: Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six year multicentric survey in the greater Paris area. J Hosp Infect. 2002 Aug;51(4): 288-96.

7. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB Maloney DG, Martin PJ, Storb RF, Marr KA Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients with allogenic haematopoietic stem cell trasplantats after nonmyeloablative conditioning. Blood. 2003 Aug 1;102(3): 827-33.Epub 2003 Apr 10.

8. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L: Epidemiology and outcome of mould infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis. 2002 Apr 1;34(7): 909-17. Epub 2002 Feb 26.

9. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA: Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. J Infect Dis 1998 Jun 177(6):1775-6.

10. Lipp HP, Hebart H, Faul C, Einsele H: Antimikrobielle Prophylaxe und Therapie bei neutropenischen Patienten. Praktische Aspekte der supportiven Therapie in Hämatologie und Onkologie, Bokenmeyer C, Lipp HP (Hrsg.), Springer Verlag 1998.

11. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Volken RH: Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition.

12. Hahn, Falke, Kaufmann, Ullamann: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 3.Auflage.

13. Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie 7.Auflage.

14. Warnock DW, Hajjeh RA, Lasker BA: Epidemiology and Prevention of Invasive Aspergillosis. Curr Infect Dis Rep 2001 Dec 3(6): 507-516.

15. Tronchin G, Esnault K, Renier G, Filmon R, Chabasse D, Bouchara JP: Expression and identification of a laminin-binding protein in Aspergillus fumigatus conidia. Infect Immun. 1997 January; 65 (1): 9-15.

16. Trochin G, Esnault K, Sanchez M, Larcher G, Marot-Leblond A, Bouchara JP: Purification and partial characterization of 32-kilodalton sialic-acid-specific lectin from Aspergillus fumigatus. Infect Immun 2002 Dec; 70(12): 6891-5.

17. Bouchara JP, Sanchez M, Chevailler A, Marot-Leblond A, Lissitzky JC, Trochin G, Chabasse D: Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by Aspergillus fumigatus conidia. Infect Immun 1997 July; 65(7): 2717-2724.

18. Bouchara JP, Trochin G, Larcher G, Chabasse D: The search for virulence determinants in Aspergillus fumigatus. Trends Microbiol 1995 Aug; 3(8): 327-30.

19. Waring P: DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. J Biol Chem. 1990 Aug 25; 265 (24): 14476-80.

20. Waring P, Eichner RD, Mullbacher A. Sjaarda A: Gliotoxin induses apoptosis in macrophages to its antiphagocytic properties. J Biol Chem. 1988 Dec 5; 263(34): 18493-9.

21. Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latge JP: Catalases of Aspergillus fumigatus. Infect Immun. 2003 Jun; 71(6):3551-62.

22. Youngchim S, Morris-Jones R, Hay RJ, Hamilton AJ Production of melanin by Aspergillus fumigatus. J Med Microbiol 2004 Mar; 53(Pt 3): 175-81 [Abstract].

23. Jahn B, Boukhallouk F, Lotz J, Langfelder K, Wanner G, Brakhage AA: Interaction of human Phagocytes with Pigmentless Aspergillus Conidia. Infection and Immunity, June 2000, p.3736-3739, Vol.68, No.6.

24. Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, Gougerot-Pocidalo MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, Latge JP: Killing of Aspergillus fumigatus by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. Infect Immun 2003 Jun; 71(6):3034-42.

25. Latgé JP: The pathobiology of Aspergillus fumigatus. Trends Microbiol, 2001, Aug;9(8): 382-9.

26. Roilides E, Lyman CA, Filioti J, Akpogheneta O, Sein T, Lamaignere CG, Petraitiene R, Walsh TJ: Amphotericin B Formulations Exert Additive Antifungal Activity in Combination with Pulmonary Alveolar Macrophages and Polymorph nuclear Leucocytes against Aspergillus fumigatus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. June 2002, p.1974-1976, Vol.46, No.6.

27. Christin L, Wysong DR, Meshulam T, Hastey R, Simons ER, Diamond RD: Human Platelets Damage Aspergillus fumigatus Hyphae and May Supplement Killing by Neutrophils. Infect Immun. March 1998, p.1181-1189, Vol.66, No.3.

28. Roilides E, Robinson T, Sein T, Pizzo PA, Walsh TJ: In Vitro and ex vivo effects of cyclosporine A on phagocytic defences against Aspergillus fumigatus. Antimicrob Agents Chemother. 1994 Dec;38(12): 2883-8.

29. Bennett JE: Aspergillose, Harrisons Innere Medizin, McGrawHill 14. Auflage, p.1372-1373.

30. Soubani AO, Chandrasekar PH: The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Chest 2002, 121:1988-1999.

31. Sugar AM: Clinical features and diagnosis of invasive aspergillosis. Up to date, vol.11 No.3.

32. Sugar AM: Aspergilloma. Up to date, vol.11 No.3.

33. Kurup VP, Mauze S, Choi H, Seymour BWP, Coffmann RL: A murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis with elevated eosinophils and IgE. J Immunol 148:3783-3788.

34. Mehlhop PD, van de Rijin M, Goldberg AB, Brewert JP, Kurup VP, Martin TR, Oetggen HC Allergen-induced bronchial hyperactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. Immunology Vol.94 pp. 1344-1349 February 1997.

35. Babbin Ba, Greene JN, Vega R, Iravani S, Ku NNK, Sandin R: Pathologic manifestations of invasive pulmonary aspergillosis in cancer patients: the many faces of aspergillus. Cancer control, November/December 2000, Vol.7, No.6.

36. Stevens DA: Diagnosis of fungal infections: current status. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2002)49 11-49.

37. Stynen D, Goris A, Sarfati J, and Latgé JP**.** 1995: A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 33**:**497-500.

38. Musher B, Fredriks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA: Aspergillus-Galactomannan Enzyme Immunoassay and quantitative PCR for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis with BAL Fluid. Journal of Clinical Microbiology 42, 5517-22, 2004.

39. Bernabé FF, Pinel CC, Lobeau B, Thomas PA, Grillot R: Aspergillus fumigatus Antigen Detection in Sera from Patients at Risk for Invasive Aspergillosis. Journal of Clinical Microbiology January 2000, p.483-443, Vol.38 No.1.

40. Rogers TR, Hagnes KA, Barnes RA: Value of antigen detection in predictivy pulmonary aspergillosis 1990 Lanzetii 1210-1213.

41. Sabetta JR, Miniter P, Andriole PJ: The diagnosis of invasive aspergillosis by an enzyme-linked immunosorbent assay for circulating antigen Journal Infect Dis 152:946-953 1985.

42. Hearn VM, Pinel C, Blachier S, Ambroise-Thomas P, Grillot R: Specific antibody detection in invasive aspergillosis by analytical isoelectrofocusing and immunoblotting methods Journal of Clinical Microbiology 04 1995 982-986, Vol. 33, No.4.

43. Hayette MP, Vaira D, Susin F, Boland P, Christiaens G, Melin P, de Mol P: Detection of Aspergillus Species DNA by PCR in BAL Fluid. Journal of Clinical Microbiology, June 2001, p.2338-2340 Vol. 39, No.6.

44. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Baldus M, Bräuninger S, Hehlmann R: Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect Aspergillus species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients. British Journal of Haematology, 2002, 116, 803-811.

45. Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M: PCR detection of DNA specific for Aspergillus species in serum of patients with aspergillosis. J Clin Mikrobiol 1996;34 (10):2464-8.

46. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Muller CA, et al.: Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molevular probes. J Clin Microbiol 1997;35(6):1353-60.

47. Raad I, Hanna, Sumoza, Albitar: Polymerase Chain Reaction on Blood for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. Cancer February 15, 2002, Volume 94 Number 4.

48. Hebart H, Löffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Böhme A et al.: Early

detection of Aspergillus infection after allogenic stem transplantation by polymerase chain reaction screening. J Infct Dis 2000;181:1713-9.

49. Löffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H: Comparison between Plasma and Whole Blood Specimens for Detection of Aspergillus DNA by PCR.
50. Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagmayer L, Schumacher U, Einsele H: Quantification of Fungal DNA by Using Fluorescence Resonance Energy Transfer and the Light-Cycler System. Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2000, p.586-590.

51. Jones JM: Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Clin Microbiol Rev 1990; 3:32-45.

52. Prentice HG, Hann IM, Herbrecht R, et al.: A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients. Br J Haematol 1997;98: 711-718.

53. Hope WW, Denning DW: Invasive aspergillosis: current and future challenges in diagnosis and therapy. Clin Microbiol Infect 2004; 10; 2-4.

54. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF et al: Voriconazole versus Amphotericin B for primary therapy of invasive Aspergillosis. The New England Journal of Medicine, Vol 347, No.6, August 8, 2002 p.408-415.

55. Warnock PW: Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. J antimicrob Chemother 1998 Jun 41 Suppl D:95-105.

56. Bernard A, Caillot D, Couaillier JF, Casasnovas O, Guy H, Farre JP: Surgical Management of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Neutropenic Patients. Ann Thorac Surg 1997 Nov 64:1441-7.

57. Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts M: Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. Blood, 15 March 2001, Vol. 97, No.6, pp. 1604-1610.

58. Becker MJ, de Marie S, Willemse D, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IAJM: Quantitative Galactomannan Detection IS Superior to PCR in Diagnosing and Monitoring Invasive Pulmonary Aspergillosis in an Experimental Rat Model. Journal of Clinical Microbiology, April 2000, p. 1434-1438, Vol. 38, No.4.

59. Maertens J, Verhaegen J, Demuynck H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P, Van Eldere J, Verbist L, Boogaerts M: Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich

enzyme–linked immunosorbent assay for haematological patients at risk for invasive aspergillosis. J Clinical Microbiology, October 1999, p. 3223-3228, Vol 37, No.10.

60. Chopra R.: AmBisome in the treatment of fungal infections: the UK experience. J Antimicrob Chemother. 2002 Feb; 49 Suppl 1: 43-7.

61. Ferns RB, Fletcher H, Bradley S, Mackinnon S, Hunt C, Tedder RS: The prospective evaluation of a nested polymerase chain reaction assay for the early detection of Aspergillus infection in patients with leukaemia or undergoing allograft treatment. British Journal of Haematology, 2002, 119, 720-725.

62. Löffler J, Gebart H, Sepe S, Schumacher U, Klingebiel T, Einsele H: Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. Medical Mycology, 36, 275-279.

63. Williamson ECM, Leeming JP, Palmer HM, Steward CG, Warnock D, Marks DI, Millar MR: Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. British Journal of Haematology, 2000, 108, 132-139.

64. Ansorg R, Heintschel von Heinegg E, Rath PM : Aspergillus antigenuria compared to antigenemia in bone marrow transplant recipients. European J Clinical Microbiol Infect Dis, 13, 582-589 1994.

65. Lass-Flörl C, Aigner J, Gunsilius E, Petzer A, Nachbaur D, Gastl G, Einsele H, Löffler J, Dierich MP, Würzner R: Screening for Aspergillus ssp. using polymerase chain reaction of whole samples from patients with haematological malignancies. British Journal of Haematology, 2001,113, 180-184.

66. Lass-Flörl C, Salzer GM, Schmid T, Rabl W, Ulmer H, Dierich PM: Pulmonary aspergillus colonization in humans and its impact on management of critically patients. British Journal of Haematology, 1999, 104, 745-747.

67. Löffler J, Hebart H, Bialek R, Hagmeyer L, Schmidt D, Serey FP, Hartmann M, Eucker J, Einsele H: Contaminations occurring in fungal PCR Assays.

68. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas D, Denning DW, Mannone L, Loper J, Couillault, Piard F , Guy H: Increasing volume and changing characteristics of IPA on sequential thoracic CT scans in patients with neutropenia. J Clin Oncol 2001 Jan;19(1):253-259.

69. Schmidt A, Wolff MH Morphological characteristics of Aspergillus fumigatus strains isolated from patient samples. Mycoses. 1997 Dec; 40(9-10): 347-351.

70. Hebart H, Löffler J, Reitze H, Engel A, Schumacher U, Klingebiel T, Bader P, Böhme A, Martin H, Bunjes D, Kern WV, Kanz L, Einsele H: Prospective screening by panfungal polymerase chain reaction assay in patients at risk for fungal infections: implications for the management of febrile neutropenia. British Journal of Haematology, 2000, 111, 635-640.

71. Deventer AJ, Goessens WH, Belkum A, Van Etten EM, Vliet HJ, Verbrugh HA: PCR monitoring of response to liposomal amphotericin B treatment of systemic candidiasis in neutropenic mice. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34, 25-28.

72. Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M.: Rapid detection of candida albicans in clinical samples by DNA amplification of common regions from c. albicans-secreted aspertic proteinase genes. J Clin Microbiol. 1998 February; 36(6): 395-401.

73. Niesters HGM, Goessens WHF, Meis JFMG, Quint WGV: Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for Candida. J Clin Microbiol 1993; 31:904-910.

74. Duthie R, Denning DW: Aspergillus fungaemia report of two cases and review. Clin Infect Dis 1995 Mar; 20(3).598-605.

75. Caillot D, Mannone L, Cuisenier B, Couaillier JF: Role of the early diagnosis and aggressive surgery in the management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. Clin Microbiol Infect. 2001; Suppl 2: 54-61.

76. Kami M, Kishi Y, Hamaki T, Kawabata M, Kashima T, Masumoto T, Oki Y, Tanaka Y, Sawada S, Machida U, Ohtomo K, Kanda Y, Hirai H, Mutou Y.: The value of the chest computed tomography halo sign in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. An autopsy-based retrospective study of 48patients.Mycoses.2002Oct;45(8):287-94.

77. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Tomas P, Grillot R: Detection of Circulating Aspergillus fumigatus Galactomannan: Value and Limits of the Platelia Test for Diagnosing Invasive Aspergillsis. J Clin Microbiol, 2003 May; 41(5): 2184-2186.

78. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, Villard O, Liu KL, Natarajan-Ame S, Lutz P, Dufour P, Bergerat JP, Canfolfi E: Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. J Clin Oncol. 2002 April 1; 20(7): 1898-906.

79. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhedin N, Rieux C, Cordonnier C: Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. Clin Infect Dis, 1998 Jun;26(6): 1407-12.

80. Hashimoto A, Yamakami Y, Kamberi P, Yamagata E, Karashima R, Nagaoka H, Nasu M: Comparison of PCR, (1,3)-beta-D-glucan and galactomannan assays in sera of rats with experimental invasive aspergillosis. J Clin Lab Anal1998; 12(5): 257-62 (Abstract).

81. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, Spiess B, Schwerdtfeger R, Cornely OA, Wilhelm S, Reuter S, Kern W, Sudhoff D, Morz H, Hehlmann R: Prospective clinical evaluation of a Light-Cycler-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. Br J Haematol 2004 Apr;125(2): 196-202.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomische Klassifikation 9
Tabelle 2: Mikroskopische Merkmale verschiedener Aspergillus-Spezies 10
Tabelle 3: Makroskopische Merkmale verschiedener Aspergillus-Spezies 11
Tabelle 4: PCR-Ergebnisse aus Serum- und Blutproben in verschiedenen Studien für den Nachweis von invasiver Aspergillose 18
Tabelle 5: Zusammensetzung des RCLB 26
Tabelle 6: Zusammensetzung des WCLB 27
Tabelle 7: Zusammensetzung des Lyticase-Buffer 27
Tabelle 8: Zusammensetzung von PCR-Mastermix 29
Tabelle 9: Zusammensetzung von PCR-Puffer 29
Tabelle 10: Light-Cycler-Sonden 33
Tabelle 11: Light-Cycler-PCR-Master-Mix 33
Tabelle 12: Zusammensetzung von PCR-Mix für die Test-Strips 35
Tabelle 13: Demographische Daten der Patienten 38
Tabelle 14: Patient 407 mit dokumentierter Aspergillose 41
Tabelle 15: Patient 291 mit Verdacht auf Aspergillose 43
Tabelle 16: Patient 412 mit Verdacht auf Aspergillose 44
Tabelle 17: Patient 413 mit Verdacht auf Aspergillose 45
Tabelle 18: Patient 415 mit Verdacht auf Aspergillose 46
Tabelle 19: Patient 297 mit Verdacht auf Aspergillose 47
Tabelle 20: Patient 411 mit Verdacht auf Aspergillose 48
Tabelle 21: Patient 286 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 49
Tabelle 22: Patient 432 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 49
Tabelle 23: Patient 425 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 50
Tabelle 24: Patient 422 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 50
Tabelle 25: Patient 409 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 51
Tabelle 26: Patient 305 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 51
Tabelle 27: Patient 410 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 52
Tabelle 28: Patient 292 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 52
Tabelle 29: Patient 426 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 52
Tabelle 30: Patient 401 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 53
Tabelle 31: Patient 295 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 53
Tabelle 32: Patient 308 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 54

Tabelle 33: Patient 424 ohne nachgewiesene Aspergillose mit positivem PCR-ELISA-Ergebnis 54
Tabelle 34: Patient 431 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 55
Tabelle 35: Patient 449 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 55
Tabelle 36: Patient 296 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 55
Tabelle 37: Patient 301 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 56
Tabelle 38: Patient 310 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 56
Tabelle 39: Patient 309 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 56
Tabelle 40: Patient 438 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 57
Tabelle 41: Patient 424 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 57
Tabelle 42: Patient 421 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 57
Tabelle 43: Patient 416 ohne nachgewiesene Aspergillose mit negativem PCR-ELISA-Ergebnis 57
Tabelle 44: Sensitivität und Spezifität der PCR-ELISA 58
Tabelle 45: Sensitivität und Spezifität der PCR-ELISA 58
Tabelle 46: Patienten mit positivem Ergebnis im Light-Cycler-System 59
Tabelle 47: Patienten mit positivem Nachweis von Aspergillus-DNA bei den Test-Strips 60

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Logarithmische Darstellung die Fluoreszenz über der Zykluszahl 34
Abb. 2: Darstellung in Log-Normalverteilung von Crossing-Points und Log-Konzentration der Standards 35
Abb. 3: Errechnete Konzentration der Proben 35
Abb. 4: Aufbau des Test-Strips 36
Abb. 5: Verwendung des Test-Strips 38
Abb. 6: Auswertung des Test-Strips 38
Abb. 7: Patienten-Gruppen mit PCR-positiven und -negativen Ergebnissen 39
Abb. 8: Patient 407 mit dokumentierter Aspergillose 42
Abb. 9: Patient 291 mit Verdacht auf Aspergillose 43
Abb. 10: Patient 412 mit Verdacht auf Aspergillose 44
Abb. 11: Patient 413 mit Verdacht auf Aspergillose 45
Abb. 12: Patient 415 mit Verdacht auf Aspergillose 46
Abb. 13: Patient 297 mit Verdacht auf Aspergillose 47
Abb. 14: Patient 411 mit Verdacht auf Aspergillose 48

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt dies für meinen Doktorvater Prof. Dr. Hermann Einsele für die Vergabe des Themas und das Interesse an der Arbeit.

Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. Jürgen Löffler für die engagierte und motivierende Betreuung, für seine stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Frau Ingrid Kumbier, Frau Ingeborg Wagner, Frau Maria Markuljin und Frau Frederike Frank danke ich für die praktische Unterstützung und Einführung in die Laborarbeit sowie für die nette Atmosphäre im Labor.

Frau Nicole Flues möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

Herrn Garbis Sahak und Frau Renate Schwedes möchte ich für die Verfügungsstellung der patientenbezogenen Daten danken.

Für die großartige Unterstützung und die Durchsicht des Manuskriptes danke ich Frau Maria Hatzigiannakoglou-Borik und Herrn Stefan Borik.

Für die technische Unterstützung und die große Hilfsbereitschaft möchte ich Frau Christina Afentoulidou danken.

Lebenslauf

Name	Paschalinou
Vorname	Sofia
Geburtsdatum/-ort	02.05.1977 in Komotini/Griechenland
Familienstand	ledig

Schulbildung

1983-1989	Grundschule in Komotini/Griechenland
1989-1992	Gymnasium in Komotini/Griechenland
1992-1995	Lyceum in Komotini/Griechenland
1995	Abitur in Komotini/Griechenland
1995-1996	Sprachkurs Deutsch im Sprachinstitut Tübingen

Studium

ab April 1997	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
31.08.1999	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
12.04.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Rottenburg a.N.
21.11.2002-21.09.2003	Praktisches Jahr 1. Tertial: Chirurgie, Hippokration KH der Aristotle Universität von Thessaloniki/Griechenland 2. Tertial: Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen 3. Tertial: Innere Medizin, Universitätsklinikum Tübingen
10/2004	Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

seit 01.06.2004	Assistenzärztin in der Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen.