

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
Der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele**

**Diagnostik der invasiven Aspergillose bei immunsupprimierten  
Patienten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Marcel Bernhardt  
aus Ingolstadt**

**Würzburg, Oktober 2012**

**Referent:** Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Korreferent:** Prof. Dr. Joachim Morschhäuser

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 25. April 2014

**Der Promovend ist Arzt**

## Inhalt

|  |    |
|--|----|
| 1. Einleitung .....                          | 1  |
| 1.1 Pilze .....                              | 1  |
| 1.1.1 Morphologie .....                      | 1  |
| 1.1.2 Vermehrung .....                       | 2  |
| 1.2 Medizinisch relevante Pilze .....        | 2  |
| 1.2.1 Sproßpilze .....                       | 3  |
| 1.2.2 Schimmelpilze .....                    | 4  |
| 1.2.2.1 Aspergillus fumigatus.....           | 4  |
| 1.3 Invasive Aspergillose .....              | 5  |
| 1.3.1 Epidemiologie .....                    | 5  |
| 1.3.2 Pathogenese und klinisches Bild.....   | 6  |
| 1.3.3 Diagnostik der IA.....                 | 8  |
| 1.4 Fragestellung .....                      | 11 |
| 2. Patienten, Material und Methoden.....     | 12 |
| 2.1 Patienten.....                           | 12 |
| 2.2 Materialien .....                        | 14 |
| 2.2.1 Untersuchungsmaterial .....            | 14 |
| 2.2.1 Verwendete Geräte .....                | 14 |
| 2.2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....  | 15 |
| 2.3 Methoden.....                            | 16 |
| 2.3.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut.....      | 16 |
| 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....   | 17 |
| 2.3.2.1 18S – PCR.....                       | 17 |
| 2.3.2.2 Real-time-PCR / ITS-PCR.....         | 19 |
| 2.3.2.3 SidA-PCR.....                        | 25 |
| 2.3.3 Platelia™ - Sandwich-ELISA .....       | 27 |
| 3. Ergebnisse.....                           | 28 |
| 3.1 Einteilung der Patientengruppen .....    | 28 |
| 3.2 Ergebnisse der Verfahren .....           | 31 |
| 3.2.1 Ergebnisse 18-S-PCR.....               | 31 |
| 3.2.2 Ergebnisse der ITS-Real time-PCR:..... | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.3 Ergebnisse der SidA-Real-Time-PCR .....                | 35 |
| 3.2.4 Ergebnisse von Platelia™ .....                         | 36 |
| 3.3. Ergebnisse für „indeterminate“-Patienten .....          | 38 |
| 3.4 Ergebnisse für „possible“- und „probable“-Patienten..... | 50 |
| 4. Diskussion .....  | 61 |
| 5. Zusammenfassung.....                                      | 66 |
| 6. Verwendete Literatur.....                                 | 68 |
| 7. Bildnachweis .....  | 73 |

## **1. Einleitung**

### **1.1 Pilze**

Pilze stellen mit geschätzten 300.000 Exemplaren eine sehr vielgestaltige Art dar. Doch nur wenige Vertreter sind potentiell humanpathogen. Im Gegensatz zu Bakterien sind Pilze auch kein Bestandteil der normalen Körperflora, abgesehen von *Candida albicans*, der bei manchen Menschen Haut und Gastrointestinaltrakt besiedeln kann. Im Unterschied zu Bakterien sind Pilze eukaryot, sie unterscheiden sich jedoch auch von tierischen bzw. menschlichen Zellen in mehreren Punkten.

#### **1.1.1 Morphologie**

Der Zellkern von Pilzzellen ist – wie bei tierischen Zellen – mit einer Membran vom Cytoplasma abgegrenzt. Der Chromosomensatz kann haploid oder diploid vorliegen. Kerne solcher Pilze, die sich sexuell vermehren (sogenannte perfekte Pilze wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*) durchlaufen einen Wechsel von Haplo- und Diplophase. Auch die Anzahl der Chromosomen ist von Art zu Art unterschiedlich. Die Struktur der DNA ist analog zu der tierischer Zellen, so existieren proteinkodierende Abschnitte mit Strukturen wie Zentromer und Telomer, Abschnitte für die DNA-Replikation und auch Introns unterschiedlicher Größe.

Ein wichtiger Unterschied zu tierischen Zellen ist der Aufbau der cytoplasmatischen Membran, die zwar ebenfalls aus einer Lipiddoppelmembran besteht, deren Hauptlipidkörper allerdings Ergosterin und nicht – wie bei tierischen Zellen – Cholesterin ist. Darüber hinaus ist die Pilzzelle von einer Zellwand umgeben, die aus Proteinen, Lipiden und Polysacchariden (Glukane, Mannane, Chitin) aufgebaut ist.

Die meisten Pilze imponieren in ihrer Grundform als Sprosszelle oder Hyphe. Sprosszellen sind runde bis ovale Pilzzellen, Hyphen hingegen

schlauchartige Strukturen, die ebenfalls von einer Zellwand umgeben und häufig auch septiert sind.

### **1.1.2 Vermehrung**

Grundsätzlich können Pilze auf zweierlei Arten wachsen, als Einzeller (Hefen) oder als mehrzellige Gebilde (Schimmel- oder Fadenpilze).

Typische Vermehrungsform von Hefen ist die Sprossung. Hierbei stülpt die Mutterzelle sich an einer Stelle ihrer Zellwand aus. Nach Kernteilung wandert ein Tochterkern in den neu entstandenen Spross und dieser trennt sich von der Mutterzelle.

Bei Faden- und Schimmelpilzen verbinden sich die Zellen zu einem filiformen Gebilde, der Hyphe. Ein Verband mehrerer Hyphen die ein Geflecht bilden, nennt man Myzel. Das Myzel dient sowohl der Nährstoffversorgung (Substratmyzel) als auch der Fortpflanzung (Luftmyzel). Das Luft- oder Reproduktionsmyzel bildet spezielle Fortpflanzungseinheiten (Konidien oder Pilzsporen) aus.

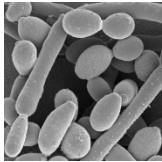
Das Wachstum von Pilzen kann vegetativ erfolgen, d.h. durch kontinuierliches Wachstum durch Sprossung (Hefen) bzw. Längenwachstum (Fadenpilze) oder fruktifikativ. Bei der fruktifikativen Vermehrung kann die sexuelle Reproduktion von der vegetativen unterschieden werden. Die sexuelle Reproduktion erfolgt über Bildung von Meiosporen nach Kernphasenwechsel, die vegetative durch Bildung von Konidien ohne Kernphasenwechsel. Konidien sind in ihrer Form sehr vielgestaltig (Phialokonidien, Arthrokonidien, Blastokonidien, Zystokonidien) und können so zur Diagnostik herangezogen werden.

### **1.2 Medizinisch relevante Pilze**

Entgegen der botanischen Klassifikation wird in der Medizin vereinfachend eine Einteilung der Pilze in vier Gruppen vorgenommen:

- Sprosspilze

- Schimmelpilze
- Dermatophyten
- dimorphe Pilze

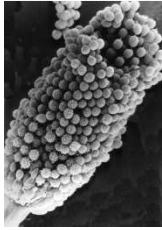


### 1.2.1 Sprosspilze

Bedeutendster Vertreter der fakultativ humanpathogenen Sprosspilze ist *Candida* spp. mit ihrem wichtigsten Vertreter *C. albicans* sowie *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. parapsilosis*, wovon nur *C. albicans* ihren Standort am Menschen und nicht in der Natur hat. Eine Erkrankung können Hefen dann auslösen, wenn Voraussetzungen für eine Ausbreitung gegeben sind so wie eine Störung der physiologischen Hautflora oder eine Immunsuppression. Pathogenitätsschritte sind Adhäsion über Mannoproteine, Sekretion lytischer Enzyme (Proteinasen, Phospholipasen) und Maskierung mit wirtseigenen Antigenen zum Unterlaufen der Abwehr.

Zu den durch *Candida* hervorgerufenen Krankheitsbildern zählen mukokutane Infektionen (Haut- und Nagelinfektionen, Soor, Ösophagitis u. a.) und systemische Formen (Pneumonie, Meningitis, Peritonitis u. a.) *Cryptococcus neoformans*, ein ubiquitär verbreiteter Sprosspilz, der häufig in Vogelkot zu finden ist, kann bei immunsupprimierten Menschen eine pulmonale Infektion hervorrufen, die dann hämatogen streuen und u. a. eine Meningoenzephalitis verursachen kann. Häufig sind hiervon AIDS-Patienten betroffen.

Auch *Pneumocystis jirovecii* stellt eine große Bedrohung für HIV-Infizierte dar. In der Lunge vieler normal immunkompetenter Menschen findet sich *Pn. jirovecii* als harmloser Kommensale, bei Immunsupprimierten jedoch kann er sich ungehemmt vermehren und ruft so eine atypische Pneumonie hervor.



## 1.2.2 Schimmelpilze

Mit geschätzten 100000 Gattungen sind Schimmelpilze eine sehr zahlreiche und verbreitete Pilzart. Sie nehmen als Saprophyten auf abgestorbener organischer Substanz eine wesentliche Rolle im Stoffkreislauf ein. Andererseits sind Schimmelpilze jedoch auch in der Humanmedizin unter bestimmten Umständen von Bedeutung, als Allergene, Mykotoxinbildner (z. B. Aflatoxin, Patulin oder Trichothecene) oder als Erreger opportunistischer Infektionen. Besonders bedeutsam sind hauptsächlich Vertreter der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus*.

### 1.2.2.1 *Aspergillus fumigatus*

*A. fumigatus* spielt in der Umwelt eine essentielle Rolle in der Wiederverwertung von Kohlenstoff und Stickstoff. Seine natürliche ökologische Nische ist der Boden, wo er auf organischem Debris überlebt und wächst. Unter allen konidientragenden Arten ist *A. fumigatus* die am weitesten verbreitete. Er bildet überreichlich Sporen, die in die Atmosphäre freigesetzt werden und mit einem Durchmesser von 2-3  $\mu\text{m}$  klein genug sind, um die menschlichen Lungenalveolen zu erreichen. Studien haben gezeigt, dass der Mensch mindestens einige Hundert Konidien von *A. fumigatus* pro Tag inhaliert. Durch Aspergillen verursachte Krankheiten betreffen daher primär die Lungen.

#### Mikroskopische Merkmale:

*A. fumigatus* ist charakterisiert durch seine grünlichen Konidien, die einen Durchmesser von 2,5 – 4  $\mu\text{m}$  haben und in Ketten produziert werden, basipetal von sechs bis acht grünlichen Phialiden, die einen Durchmesser von 2 – 3  $\mu\text{m}$  haben. Die Konidienketten werden direkt auf



breiten Vesikeln ausgebildet (20 – 30 µm). Ein sexuelles Vermehrungsstadium ist bei *A. fumigatus* nicht bekannt.

#### Makroskopische Merkmale:

*A. fumigatus* ist durch ein schnelles Wachstum gekennzeichnet. Eine Kolonie kann auf Czapek-Dox-Agar bei 25°C innerhalb einer Woche um 4 +/- 1 cm an Größe zunehmen. Es handelt sich um eine thermophile Spezies, die noch bei Temperaturen von 55°C wachsen und bei Temperaturen von über 70°C überleben kann.

[12]

### **1.3 Invasive Aspergillose**

#### **1.3.1 Epidemiologie**

Die invasive Aspergillose hat sich innerhalb der letzten zwanzig Jahre zu einer der häufigsten und bedrohlichsten Komplikationen bei immunkompromittierten Patienten entwickelt. Durch die stetige Zunahme von Transplantationen hämatopoetischer Stammzellen bei Patienten mit hämato-onkologischen Erkrankungen und die dadurch notwendig werdende Immunsuppression, aber auch durch die generell gestiegene Anzahl von Organtransplantationen hat sich das Risikokollektiv und damit auch die Inzidenz der invasiven Aspergillose erhöht. Weitere Kollektive mit erhöhter Prävalenz für invasive Mykosen sind AIDS-Patienten, Verbrennungsoffer und Frühgeborene. Die Mortalitätsrate wird unterschiedlich angegeben, erreicht aber Werte zwischen 30 und 50% [19], aber auch eine Mortalitätsrate von 88% wurde bereits angegeben [20].

Die Prävalenz für invasive Aspergillosen bei Empfängern hämatopoetischer Stammzelltransplantationen (HSCT) wurde im Rahmen einer multizentrischen Studie mit 0,5% bei autologer HSCT, mit 2,3% bei allogener, HLA-matched HSCT, mit 3,2 bei allogener HLA-mismatched HSCT und mit 3,9% bei nichtverwandtem Spender angegeben. [2]

Frühere Studien führten noch zu Schätzungen von 6-11% bei HLA-matched allogener HSCT bei verwandtem Spender [3], [4] und 10,5% bei HLA-mismatched HSCT bzw. unverwandtem Spender [4]. Die SEIFEM-2004-Studie schloss 11802 Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen ein, die keine Stammzelltransplantation erhalten hatten. Diese retrospektive Kohortenstudie kam auf eine Inzidenz von 4,6% für invasive fungale Infektionen bzw. 2,9% für Schimmelpilzinfektionen (die wiederum zu 90% von *Aspergillus* spp. ausgemacht wurden). Innerhalb dieses Kollektivs lag die Inzidenz in der Gruppe der AML-Patienten mit 12% am höchsten, bei den Plasmozytom-Patienten mit 0,5% am niedrigsten [5].

Die tatsächliche Inzidenz der invasiven Aspergillose ist jedoch nicht sicher zu beziffern, was an der lange Zeit uneinheitlichen Definition des Krankheitsbildes liegt, aber auch an Schwierigkeit, einen Beweis für das Vorliegen einer invasiven Aspergillose zu führen.

Als Risikofaktoren, die das Auftreten invasiver Aspergillosen begünstigen, wurden vor allem die Dauer der Neutropeniephase, Glucocorticosteroidgabe, Art des Spenders, Art der Grunderkrankung, Alter des Transplantatempfängers und das Auftreten und die Behandlung der Graft-versus-host-disease (GvHD) identifiziert.

### **1.3.2 Pathogenese und klinisches Bild**

Es werden vier Arten der invasiven Aspergillose unterschieden:

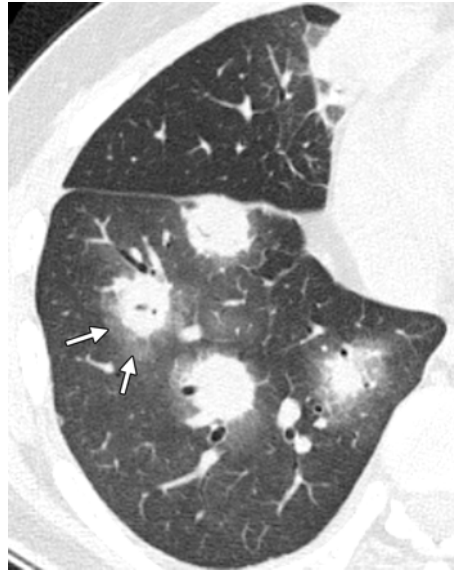
- akute oder chronische pulmonale Aspergillose
- Tracheobronchitis und obstruktive Erkrankung der Bronchien
- akute invasive Rhinosinusitis
- disseminierte Verlaufsform, häufig mit Beteiligung des Gehirns und anderer Organe

Häufigster Verursacher der IA ist nach wie vor *A.fumigatus*, aber auch *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans* und *A. terreus* können IA auslösen. Es sind

eine Vielzahl an Virulenzfaktoren ermittelt worden, die für die außerordentlich hohe Mortalität der invasiven Aspergillose verantwortlich gemacht werden können. *A. fumigatus* verfügt über zahlreiche Mechanismen zur Steigerung seines Wachstums, auch unter Stressbedingungen, zur Umgehung körpereigener Immunreaktionen und zur Schädigung des Wirtsorganismus. Entsprechend sind bereits einige Gene und Moleküle identifiziert worden, die hierzu beitragen [28].

Innerhalb des Kollektivs der Immunsupprimierten begünstigt die bei diesen Patienten meist vorliegende Kombination aus Neutropenie (Neutrophile Granulozyten  $<500/\mu\text{l}$ ), supraphysiologischen Steroidgaben oder der Gabe anderer immunsupprimierender Medikamente wie Cyclosporin die Invasion von Aspergillus-Sporen in das Lungengewebe, die unter physiologischer Immunlage nicht auftritt. Bei neutropenen Patienten ist die IA durch eine Invasion der Blutgefäße durch Hyphen charakterisiert sowie Thrombose, Nekrose und hämorrhagische Infarzierung des Lungengewebes. Der Lungenbefall äußert sich in chronischem, produktivem Husten, oft mit Hämoptysen, Fieber und Brustschmerzen, ein ebenso variabler wie unspezifischer Symptomkomplex. Fieber  $>38,5^{\circ}\text{C}$ , das nicht auf empirische antibiotische Therapie anspricht, wird oft zum Anlass genommen, eine antimykotische Therapie einzuleiten, was jedoch trügerisch sein kann, da bei IA-Patienten häufig durch eine gleichzeitige Corticosteroid-Therapie Fieber unterdrückt wird. [6]

In der Bildgebung imponiert eine akute, schnell voranschreitende, konsolidierte Infiltration. Die Infektion breitet sich per continuitatem oder hämatogen aus und kann sich im Gehirn und anderen Organen manifestieren. In der Computer-Tomographie (CT) gelten das sogenannte Halo-Sign und später das Air-crescent-sign als typisch [7]. Allerdings ist das Halo-Sign nur in frühen Erkrankungsstadien zu sehen (Caillot et al. 2001).



**Abb. 1: Halo sign in der CT**



**Abb. 2: Air crescent sign im CT**

### **1.3.3 Diagnostik der IA**

Die definitive Diagnostik der invasiven Aspergillose bleibt eines der größten Probleme, was sowohl die Therapie erschwert als auch zu einer systematischen Unterschätzung der tatsächlichen Inzidenz dieser Erkrankung führt.

Denkbar sind kulturelle, serologische, mikrobiologische und mikroskopische Nachweisverfahren.

Für einen kulturellen Nachweis von *A. fumigatus* kommen Biopsate, Abszesspunktate, Abstriche und Sekrete aus dem Respirationstrakt in Betracht. *Aspergillus spp.* können auf Sabouraud-Agar bei 25-37°C innerhalb von zwei bis drei Tagen angezüchtet werden, wobei jedoch zu beachten ist, dass es sich aufgrund des ubiquitären Vorkommens von *A.*

*fumigatus* um Kontaminations-Artefakte handeln könnte. Eine Kombination aus kulturellem und mikroskopischem Nachweis sichert die Diagnose und erlaubt auch die Speziesidentifizierung und eine Resistenztestung gegen Antimykotika [1].

Eine mikroskopische Diagnosesicherung gelingt über den Nachweis von Hyphen oder Konidiophoren in Schnittpräparaten von Gewebeproben (PAS-Reaktion nach Grindley oder Versilberung nach Gomori) oder in Respirationssekreten (Gram- oder Giemsa-Färbung). Auch der mikroskopische Nachweis unterliegt der Einschränkung, dass die Gewinnung von geeigneten Proben, v. a. von Biopsien aus betroffenem Gewebe, bei den oft schwerkranken Patienten nicht möglich ist, sodass eine Diagnosesicherung oft erst post mortem erfolgen kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Diagnostik bietet sich über den Nachweis von *Aspergillus*- bzw. Pilz-spezifischen Antigenen. Hier haben besonders die Detektion von (1,3)- $\beta$ -D-Glucan (BDG) und von Galaktomannan (GM) einen hohen Stellenwert. BDG als ubiquitäre Komponente diverser fungaler Spezies und GM als Zellwandbestandteil von Pilzen können über ein „Sandwich“-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) nachgewiesen werden, entsprechende kommerziell erhältliche Kits sind bereits verfügbar (Fungitell™ für BDG und Platelia™ für GM) [14]. Platelia™ erlaubt zwei bis drei Wochen früher einen Nachweis von GM als herkömmliche Latex-Agglutinationstests. Auch eine Korrelation von Antigenkonzentration und Ausbreitungsgrad der Erkrankung ist möglich.

Unter den molekularbiologischen Verfahren hat die Polymerase-Kettenreaktion einen besonders wichtigen Rang in der Labordiagnostik. Die 1988 erstmals vorgestellte Methode erlaubt die Vervielfachung eines bestimmten Nukleotid-Abschnitts. Hierzu werden kleine, den zu vervielfältigenden Abschnitt flankierende DNA-Abschnitte benötigt, die sogenannten „Primer“, außerdem ein hitzestabiles Enzym zur Replikation, die Taq-Polymerase. Als Materialien eignen sich Serum, Bronchiallavage-

Flüssigkeit (BAL), Vollblut oder Plasma sowie Liquor und Gewebsbiopsien. Letztere sind wegen der schweren Erkrankung der Patienten meist kontraindiziert. BAL-Proben haben zudem den Nachteil, dass sie zum einen schwieriger zu gewinnen sind als Blutproben, zum anderen ein hohes Risiko für Kontamination durch *Aspergillus* aus der Umgebungsluft aufweisen [15]. Gleichwohl haben sich neben Serumproben BAL-Proben als zweite hauptsächliche Standard-Probe etabliert.

Der Nachweis von fungaler DNA bzw. von *Aspergillus*-DNA in Serumproben wird als sehr vielversprechend für die Frühdiagnostik erachtet [21] und ist deswegen intensiv erprobt worden. Viele hundert Publikationen wurden über die Detektion von fungaler DNA seither veröffentlicht, jedoch hat bislang keine zufriedenstellende Standardisierung und Validierung der Methoden gelingen können. Welches PCR-Assay am geeignetsten ist, hängt von den Anforderungen ab, die an die Methode gestellt werden. Das Assay kann zur Diagnose einer Pilzinfektion allgemein genutzt werden (panfungales Assay), zur Diagnose einer IA (idealerweise noch vor Einsetzen klinischer Symptome) oder zur Verlaufskontrolle bei antifungaler Therapie. Als zu replizierende DNA-Abschnitte bieten sich insbesondere multi-copy-Gene an, also Gene, die in hoher Zahl vorliegen, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, sie erfolgreich in so großer Zahl zu replizieren, dass ein Nachweis gelingen kann. Als vielversprechende Zielregion hat sich in den letzten Jahren die ribosomale DNA-Genregion herauskristallisiert. Diese ist aus dem 18S-Gen (1800 bp), dem 5.8S-Gen (159 bp) und dem 28S-Gen (3396 bp) aufgebaut, welche jeweils durch sogenannte „internal transcribed spacer“ (ITS) voneinander getrennt werden, ITS 1 (361 bp) und ITS 2 (231 bp). Zu diesen verschiedenen Komponenten wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt. [9], [16], [17], [18], [30]

Lange Zeit existierte keine einheitliche Definition der IA, erst die Einführung verbindlicher Diagnosekriterien durch die European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 2002 [8] setzte einen verbindlichen Standard. Gemäß den EORTC-Kriterien, die eine Kombination aus Wirtsfaktoren („host factors“), mikrobiologischen/mykologischen Nachweis-verfahren und klinischem Bild zugrundelegt, wird unterschieden zwischen

- proven aspergillosis
- probable aspergillosis
- possible aspergillosis
- indeterminate

Um das Kriterium „proven aspergillosis“ zu erfüllen ist der direkte Nachweis von Pilzhyphen in Gewebeproben/-biopsien erforderlich oder die Anzucht von Pilzkolonien aus solchem Gewebe, das aus normalerweise sterilen Körperregionen stammt. Ein solcher Nachweis ist jedoch schwer zu führen, da Patienten mit dem Risiko für IA häufig eine erhöhte Blutungsneigung haben bzw. in allgemein schlechtem oder gar kritischem Zustand sind, weswegen eine Biopsieentnahme sich meistens verbietet.

Um eine adäquate antifungale Therapie durchführen zu können, ist es entscheidend, diese früh genug zu beginnen. In Ermangelung eines geeigneten Verfahrens zur Frühdiagnose der IA werden bislang in der Regel gefährdete Patienten (vor allem solche nach HSCT) empirisch antimykotisch behandelt, was wegen der zahlreichen Nebenwirkungen dieser Medikamente und nicht zuletzt der hohen Kosten ein mehr als unbefriedigendes Vorgehen ist.

#### **1.4 Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit war, mehrere, teils etablierte, teils neue PCR-Verfahren und ein Antigen-Nachweisverfahren miteinander zu vergleichen im

Hinblick auf ihre jeweilige Sensitivität, ihre Sensibilität, ihre Korrelation untereinander und ihre Korrelation mit der Risikogruppeneinteilung nach den EORTC-Kriterien. Das Patientenkollektiv wurde von Patienten gebildet, die aufgrund hämato-onkologischer Grunderkrankungen eine chemotherapeutische Induktions- oder Konsolidationstherapie erhielten oder bei denen eine hämatopoetische Stammzelltransplantation durchgeführt wurde. Insgesamt wurden 43 Patienten erfasst.

Verglichen werden sollten ein konventionelles, panfungales PCR-Verfahren, ein neuentwickeltes, Aspergillus-spezifisches Real-Time-PCR-Verfahren (RT-PCR) und ein Nested-PCR-Verfahren, außerdem das bereits etablierte ELISA-Kit zur Detektion von Galactomannan Platelia® (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, Frankreich).

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

In diese Arbeit wurden insgesamt 43 Patientinnen und Patienten eingeschlossen, die im Zeitraum zwischen dem 1. 6. 2007 und dem 31. 10. 2007 in verschiedenen Abteilungen der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg stationär waren. Eingeschlossen wurden Patienten, die Empfänger einer allogenen Knochenmarkstransplantation (AKT) oder peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSCT) waren oder Patienten, die aufgrund hämato-onkologischer Erkrankungen behandelt wurden bzw. solche Patienten, auf welche beides zutraf. Häufigste Diagnosen der eingeschlossenen Patienten waren die akute myeloische Leukämie (AML, n=18) und die akute lymphatische Leukämie (ALL, n=13).

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 50,3 Jahre (16-75), das Geschlechterverhältnis ♂:♀ lag bei 29:23.



Die Entscheidung, welche Patienten in die Studie einbezogen wurden, wurde durch die zuständigen Fachärzte der Medizinischen Klinik Würzburg getroffen.

*Tabelle 1: Altersstruktur*

| <b>Altersgruppe (in Jahren)</b> | <b>Wert</b> |
|---------------------------------|-------------|
| 11 – 20                         | 1           |
| 21 – 30                         | 4           |
| 31 – 40                         | 6           |
| 41 – 50                         | 8           |
| 51 – 60                         | 13          |
| >60                             | 11          |
| <b>Summe</b>                    | <b>43</b>   |

*Tabelle 2: Diagnosen*

| <b>Diagnose</b>               | <b>Wert</b> |
|-------------------------------|-------------|
| AML                           | 18          |
| ALL                           | 13          |
| Multiples Myelom              | 5           |
| MDS                           | 4           |
| Anämie unbekannter<br>Ursache | 1           |
| M. Hodgkin                    | 1           |
| CLL                           | 1           |
| <b>Summe</b>                  | <b>43</b>   |

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Untersuchungsmaterial

Von allen Patienten wurden an zwei Tagen je Woche (Montag und Donnerstag) eine Serumprobe und zwei EDTA-antikoagulierte Blutproben entnommen (Sarstedt Monovetten™, Sarstedt Germany), das Maximum lag bei 30 Proben insgesamt, entsprechend 15 Wochen. Am Tag der Abnahme erfolgte die DNA-Extraktion, die Eluate wurden bei -20°C tiefgefroren, jeweils eine EDTA-antikoagulierte Blutprobe wurde als Rückstellprobe bei -20°C tiefgefroren.

### 2.2.1 Verwendete Geräte

|                          |                             |   |
|--------------------------|-----------------------------|---|
| Zentrifuge               | Centrifuge 5415             | Eppendorf, Hamburg                      |
| Zentrifuge               | Heraeus Multifuge 3s        | ThermoScientific, Waltham, MA, USA      |
| Vortex                   | Vortex-Genie 2              | Scientific Industries, Bohemia, NY, USA |
| Wasserbad                | Memmert WB 7-45             | Memmert, Schwabach                      |
| Sterilbank               | Heraeus HERAsafe KS<br>12   | ThermoScientific, Waltham, MA, USA      |
| Kühl- und Gefrierschrank | Premium No Frost<br>CN 3366 | Liebherr, Biberach an der Riss          |
| Rüttler                  | Heidolph Duomax 1030        | Heidolph Instruments, Schwabach         |
| PCR-Cycler               | LightCycler 1,5             | Roche, Mannheim                         |

|                          |   |  |
|--------------------------|---|--|
| Kühlblock                | LightCycler Centrifuge<br>Adapters        | Roche, Mannheim                        |
| Tischzentrifuge          | Galaxy mini                               | VWR International,<br>Darmstadt        |
| Sicherheits-<br>werkbank | DNA/RNA UV-Cleaner<br>UVC/T-AR            | Biosan, Riga, LV                       |
| Pipettierhilfe           | Pipetus                                   | Hirschmann Laborge-<br>räte, Eberstadt |
| Pipetten                 | Eppendorf Reference®<br>Physiocare Pack 1 | Eppendorf, Hamburg                     |

### **2.2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien**

|                              |   |  |
|------------------------------|---|--|
| Untersuchungs-<br>handschuhe | Flexam  | CardinalHealth, McGaw Park,<br>IL, USA |
| Desinfektionslösung          | Teralin Liquid  | Schülke&Mayr, Norderstedt              |
| Pipettenspitzen              | Filterspitze PP<br>nature 1-100 µl,<br>100-1000 µl,<br>0,5 -10 µl | Nerbe plus, Winsen/Luhe                |
| Vernichtungsbeutel           |   | A. Hartenstein, Würzburg               |
| Falcons 15 ml                | Cellstar PP-Test  | Greiner bio-one, Fricken-              |

Tubes, steril hausen

Zellkulturflaschen Cellstar Tissue Greiner bio-one, Frickenhausen

RCLB Pufferlösung: 1000 ml Lösung enthalten Tris 10 mMol/L Magnesiumhydrochlorid 6 Hydrat 5 mMol/L, Natriumchlorid 10 mMol/L eingestellt mit 25% HCl auf pH 7,6; sterilfiltriert und sterilisiert

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Zunächst werden die Erythrozyten lysiert. Hierzu wird die EDTA-Blutprobe mit einem RCLB (Red cell lysis buffer) versetzt, einer hypotonen Salzlösung, die einen Flüssigkeitseinstrom in die Erythrozyten und damit deren Platzen verursacht.

| <b>RCLB</b>      | <b>Konzentration</b> |
|------------------|----------------------|
| Tris (pH 7,6)    | 10 mM                |
| Magnesiumchlorid | 5 mM                 |
| Natriumchlorid   | 10 mM                |

*Tabelle 3: Zusammensetzung RCLB*

10 ml RCLB werden in einem 15 ml Falcon vorgelegt und mit 3 ml der jeweiligen EDTA-koagulierten Blutprobe vermischt. Nach 5-minütiger Inkubationszeit auf einer Horizontalwippe bei Raumtemperatur wird die Probe bei 3000g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet erneut in 10 ml RCLB gelöst, auf der Horizontalwippe bei Raumtemperatur inkubiert und bei 3000g 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wird jetzt mit Ceramic Beads vermengt und

90 Sekunden mit dem Vortex-Rüttler durchmischt. Anschließend werden 200µl Binding Puffer und 50 µl Proteinase K hinzugegeben – eine Endoprotease, die hier zum Abbau von Dnase eingesetzt wird – und das Gemisch 15 Minuten bei 70°C in ein Wasserbad gestellt. Nun wird je Probe 100 µl Isopropanol 100% hinzugegeben und mit dem Vortex verrührt. Das gesamte Volumen wird nun auf eine Quiagen-Säule pipettiert und bei 8000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Quiagen-Säulen enthalten eine Silica-Membran, die DNA während des Zentrifugationsvorgangs bindet.

In drei weiteren Schritten wird nun die an die Quiagen-Säule gebundene DNA gewaschen und gelöst, wozu zunächst 500µl eines Inhibitor Removal Buffers aufgetragen werden und bei 8000 U/min eine Minute zentrifugiert wird. Anschließend wird je zweimal 500µl eines Waschpuffers aufgetragen und ebenfalls bei 8000 U/min zentrifugiert. Zuletzt wird durch Zentrifugieren auf höchster Stufe für 2 Minuten die Säule getrocknet und in einem letzten Schritt die DNA eluiert. Hierzu werden 100µl Elution buffer aufgetragen und erneut für eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Die DNA liegt nun als Eluat vor.

## **2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

### **2.3.2.1 18S – PCR**

Das erste durchgeführte PCR-Verfahren ist eine sogenannte konventionelle PCR. Es wurde von Einsele et al. entwickelt. Der zu replizierende DNA-Abschnitt ist eine hochkonservierte Region des für die 18s-Ribosomenuntereinheit codierenden multicopy-Gens der rRNA, der für eine große Zahl von Pilzen spezifisch ist, darunter auch *A. fumigatus* und *A. flavus*. Es handelt sich mithin um ein *panfungales* PCR-Assay, das nahezu alle klinisch relevanten Pilze erfasst.

Der erfasste DNA-Abschnitt hat eine Länge zwischen 482 und 503 bp, abhängig von der jeweils erfassten Spezies.

Zum Ansatz der PCR wird zunächst ein sogenannter Mastermix benötigt, der alle zur Amplifikation der Zielsequenz nötigen Reagenzien enthält:

- PCR-Puffer zur Aufrechterhaltung des richtigen pH-Wertes
- $Mg^{2+}$  als Cofaktor für die verwendete Polymerase (Thermophilus aquaticus-Polymerase = Taq-Polymerase)
- Digoxigenin-markierte Nucleotide, dNTPs
- zwei die Zielsequenz einfassende Primer:
  - o a) 5' – ATT ggA CAA gTC Tgg Tg (“primer forward”)
  - o b) 5' – CCg ATC CCT AgT Cgg CAT Ag (“primer reverse”)
- Taq-Polymerase

*Tabelle 4: Zusammensetzung Mastermix 18s-PCR*

| <b>PCR-Mastermix</b> | <b>Konzentration</b> | <b>Volumen</b> |
|----------------------|----------------------|----------------|
| Wasser               | -                    | 25,75 $\mu$ l  |
| 10X Puffer           | 1x                   | 5 $\mu$ l      |
| MgCl                 | 25 mM                | 4 $\mu$ l      |
| dNTPs                | 10 mM                | 1 $\mu$ l      |
| Primer for.          | 131 pM/ $\mu$ l      | 2 $\mu$ l      |
| Primer rev.          | 131 pM/ $\mu$ l      | 2 $\mu$ l      |
| Taq                  | 5 Units/ $\mu$ l     | 0,25 $\mu$ l   |

Das Gesamtvolumen beträgt 40  $\mu$ l pro zu untersuchender Probe. Hinzu kommen 10  $\mu$ l des zu testenden DNA-Eluats. Zu jedem Lauf wurden außerdem eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und eine Mastermix-Kontrolle hinzugefügt. Für die Positivkontrolle wurde eine Serumprobe mit A.fumigatus-Konidien gespiked und nach oben angegebener Vorgehensweise die DNA extrahiert. Als Mastermix-Kontrolle wurden 10  $\mu$ l DNA-graded water hinzugefügt.

Die PCR wurde an zwei verschiedenen Geräten durchgeführt, einem 9800 FastThermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und einem Mastercycler epgradient (Eppendorf, Hamburg).

PCR-Temperaturprofil, 35 Zyklen:

|                         |      |        |
|-------------------------|------|--------|
| Initiale Denaturierung  | 94°C | 4 min  |
| Denaturierung           | 94°C | 30 sec |
| Annealing               | 62°C | 1 min  |
| Extension               | 72°C | 2 min  |
| Terminale Denaturierung | 72°C | 5 min  |

Die Amplifikationsprodukte müssen mithilfe einer Gelelektrophorese quantifiziert werden. Hierzu wird von jeder Probe jeweils ein Aliquot von 10µl auf ein 2%iges Agarose-Gel in 1X TAE-Puffer (pH 8,0, 40mM Tris-Acetat, 2 mM Natrium-EDTA) aufgetragen, welches mit Ethidiumbromid versetzt wurde. Nach genügend langer Laufzeit wird das Gel unter UV-Licht photographiert und bei ca. 500 bp das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Bande dokumentiert. Wurde eine Bande im Bereich von 500 bp gefunden, wurde dies als „positiv“ für das Vorhandensein von Pilz-DNA in der entsprechenden Patientenprobe gewertet. Bei unklaren Befunden wurde die Probe erneut amplifiziert und die Gelelektrophorese wiederholt.

### **2.3.2.2 Real-time-PCR / ITS-PCR**

Als zweites, neu eingeführtes Verfahren wurde eine Real-time-PCR (RT-PCR) durchgeführt.



**Abb. 3: Roche LightCycler™ 2.0**

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 Luft eine sehr geringe Wärmekapazität besitzt, wird der Prozess schneller durchgeführt als z. B. mit einem konventionellen Thermoblock. Die PCR läuft in speziellen Borglaskapillaren ab. Diese Kapillaren besitzen ein günstiges Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, das die schnelle Einstellung eines Gleichgewichts zwischen heißer Luft und den Proben ermöglicht. Das Einsetzen von Luft statt eines Wärmeblocks und das große Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis der Kapillaren ermöglichen die Durchführung eines einzigen PCR-Zyklus in weniger als 30s.

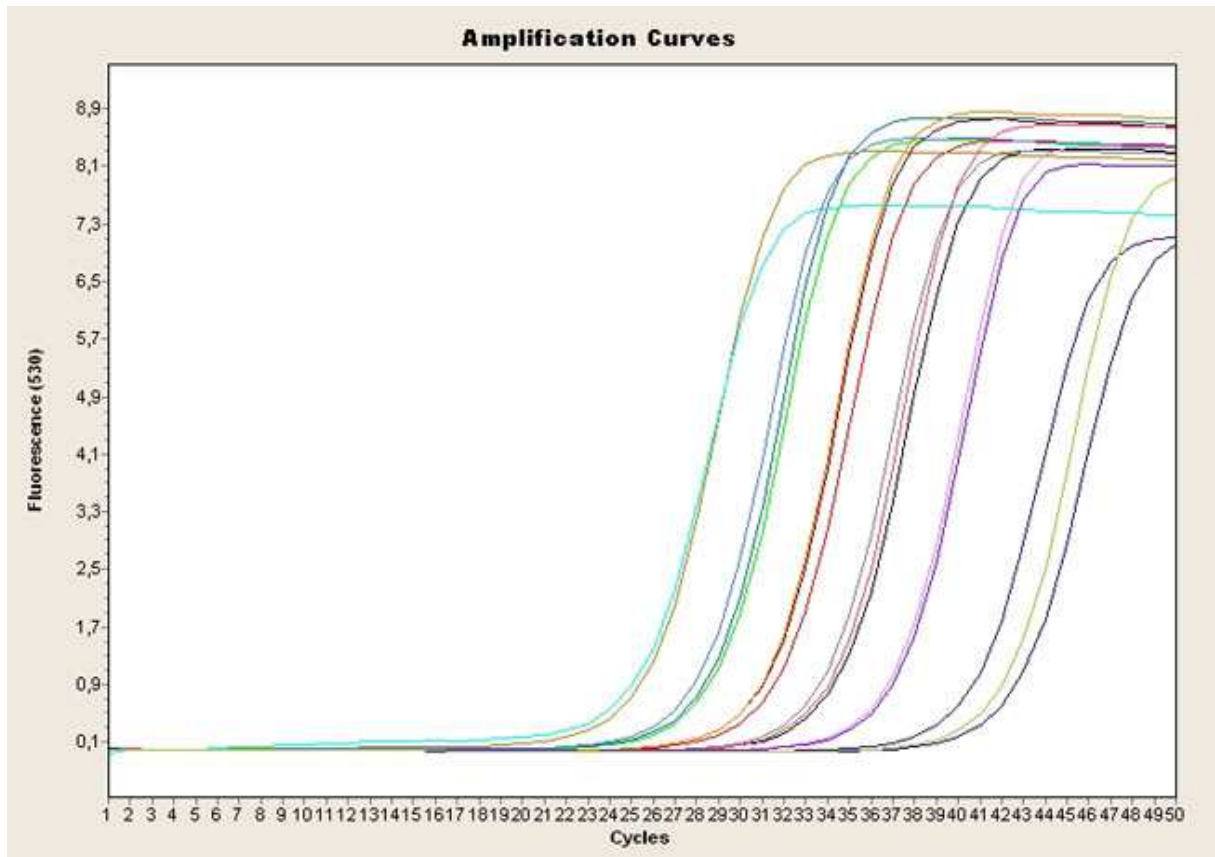
Pro Arbeitszyklus können 32 Proben eingesetzt werden, welche in einem Karussell angeordnet sind. Das optische System des Light-Cyclers verfügt über eine lichtemittierende Diode (LED) und drei Messkanäle, die das emittierte Fluoreszenz-Licht bei drei verschiedenen Wellenlängen messen können: Kanal 1 für 530nm, Kanal 2 für 640nm und Kanal 3 für 710nm. Die Messzeit für jede Probe beträgt etwa 20ms.

Zur Messung der Fluoreszenz werden spezielle Sonden eingesetzt, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Zum sequenzspezifischen quantitativen 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 Fluoreszenzfarbstoffen: „3'FL“, die mit Fluoreszein



markiert ist und „5'LC“, die mit Red 640 markiert ist. Wenn die beiden Sonden im Zuge des Amplifikationsprozesses (während der annealing-Phase) an ihre jeweilige Target-Sequenz binden, befinden sie sich auf dem DNA-Einzelstrang im Abstand von genau einer Base. Eine im Gerät befindlich blaue Lichtquelle regt die am 3'-Ende mit Fluoreszin markierte Sonde an, welche daraufhin ein grünes Licht mit der Wellenlänge von 640 nm aussendet. Durch dieses wiederum wird die 5'-Red 640-markierte Sonde angeregt und sendet ihrerseits Licht der Wellenlänge 640 nm aus. Dieses Licht kann am Ende der annealing-Phase im Kanal 2 des optischen Apparates des LightCycler™ detektiert werden. In der anschließenden Elongationsphase werden die Sonden wieder vom Einzelstrang verdrängt und es wird kein Licht mehr ausgesendet, es wird daher auch kein Signal mehr gemessen. Während der auf die Elongation folgenden Phase der Denaturierung findet keine Hybridisierung der Sonden mit dem DNA-Einzelstrang statt und es wird daher ebenfalls kein Signal aufgezeichnet.

Das Ergebnis jeder Messung sind die sogenannten „crossing points“. Dies sind die Punkte die den Zyklus anzeigen, ab welchem die im LightCycler™ gemessene Fluoreszenz linear ansteigt. Je mehr Nucleinsäure in einer Probe detektiert wurde, desto geringer ist demnach die Zahl an Zyklen die nötig sind, um die Fluoreszenz linear ansteigen zu lassen und desto geringer ist der entsprechende Wert.

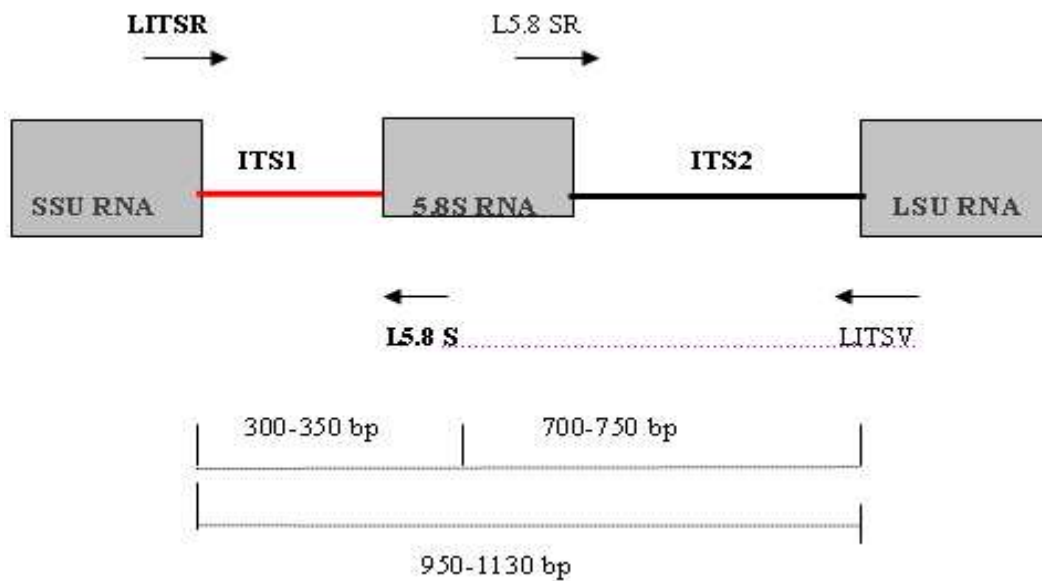


**Abb. 4: Beispiel für Amplifikationskurven mit „crossing points“ von 27 bis 44**

Da die eingesetzten Primer oft universell sind und mehrere verschiedene Pilzspezies amplifizieren können, wird am Ende jedes LightCycler™-Laufes eine sogenannte Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, mit welcher man feststellen kann, ob eines oder mehrere verschiedene Amplifikationsprodukte entstanden sind. Hierbei macht man sich zunutze, dass die Sonden auch mit solchen Amplifikaten hybridisieren, die nicht in allen Basen exakt komplementär sind. So entstandene Amplifikat-Sonden-Hybride schmelzen aufgrund der geringeren Bindungskräfte bereits bei niedrigeren Temperaturen ab als solche, die in mehr oder allen Basen komplementär sind. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur von 50°C bis 95°C kontinuierlich in Schritten von 0,2°C pro Sekunde erhöht und dadurch die vorliegende Doppelstrang-DNA denaturiert. Da nun erneut eine Hybridisierung zwischen Sonden und

Einzelsträngen stattfindet, entstehen auch wieder Fluoreszenzsignale, die gemessen werden. Die dabei entstehenden Schmelzkurven können zur Analyse herangezogen werden.

Die hier genutzte Zielregion umfasst nun keine für ein Protein kodierende Region, sondern diejenige, welche als nichtkodierende Abschnitte zwischengeschaltet sind. Diese nicht-kodierenden Abschnitte werden „internal transcribed spacer“ (ITS) genannt.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der ITS-Abschnitte innerhalb des ribosomalen Operons**

Im Gegensatz zu den für die Ribosomen-Untereinheiten codierenden Regionen 18S, 28S und 5,8S, die artspezifisch sehr hoch konserviert sind, sind die ITS-Regionen im Laufe der Evolution durch eine Vielzahl von Mutationen verändert worden und daher sehr artspezifisch.

Der verwendete Mastermix enthält:

- DMSO
- MgCl<sub>2</sub>
- Asp. Fum F (Primer 1)
- Fungi 5.8\_R (Primer 2)

- Sonde FL
- Sonde LC
- Taq

*Tabelle 5: Mastermix-Zusammensetzung ITS-Real-Time-PCR*

| <b>PCR-Mastermix</b>       | <b>Konzentration</b> | <b>Volumen</b> |
|----------------------------|----------------------|----------------|
| DMSO<br>(Dimethylsulfoxid) |                      | 1,25 µl        |
| MgCl <sub>2</sub>          | 5 mM                 | 4,00 µl        |
| Primer 1                   | 5 pmol               | 0,25 µl        |
| Primer 2                   | 5 pmol               | 0,50 µl        |
| Sonde FL                   | 3 pmol               | 1,00 µl        |
| Sonde LC                   | 3 pmol               | 1,00 µl        |
| Taq                        |                      | 2,00 µl        |

Das Gesamtvolumen pro Reaktion beträgt 10 µl, hinzu kommen 10 µl des DNA-Eluats. Auch hier wurden eine Positiv-, eine Negativ- und eine Mastermixkontrolle hinzugefügt.

PCR-Temperaturprofil:

|                        |  |         |                   |
|------------------------|--|---------|-------------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C   | 9 min   | 20°C/sec          |
|                        | Analysis mode: none                                    |         | Acquisition mode: |
|                        | none   |         |                   |
|                        | Zyklen: 1  |         |                   |
| Amplifikation          | 95°C   | 10 sec  | 20°C/sec          |
|                        | Acquisition mode: none                                 |         |                   |
|                        | 54°C   | 30 sec  | 20°C/sec          |
|                        | Analysis mode: Quantification Acquisition mode: single |         |                   |
|                        | 72°C   | 25 sec  | 20°C/sec          |
|                        | Acquisition mode: none                                 |         |                   |
|                        | Zyklen: 50   |         |                   |
| Melting                | 95°C   | 20 Sec. | 20°C / Sec.       |

|               |                              |         |                        |
|---------------|------------------------------|---------|------------------------|
|               |                              |         | Acquisition Mode: none |
|               | 40°C                         | 30 Sec. | 20°C / Sec.            |
|               |                              |         | Acquisition Mode: none |
|               | 85°C                         | 0 Sec.  | 0,20°C / Sec.          |
|               | Analysis Mode: Melting curve |         | Acquisition Mode:      |
|               | continuous                   |         |                        |
|               | Cycle:                       | 1       |                        |
| Cooling       | 40°C                         | 30 Sec. | 20°C / Sec.            |
|               | Analysis Mode: none          |         | Acquisition Mode: none |
|               | Cycle:                       | 1       |                        |
| Analysemodus: | F2 / F1                      |         |                        |

### 2.3.2.3 SidA-PCR

Eisen ist ein essentielles Element für alle eukaryotischen Organismen. Es wird für Zellfunktionen wie DNA-Synthese und –reparatur, Atmung oder Detoxifikation freier Radikale gebraucht. Dabei darf das Eisen nicht in zu hoher Konzentration intrazellulär vorliegen, da es sonst die Bildung schädlicher freier Radikale katalysieren kann. Daher produzieren viele Mikroorganismen sogenannte Siderophore – Eisen-spezifische Chelatoren von niedrigem Molekulargewicht.

Wirtsorganismen können das Wachstum von pathogenen Mikroorganismen in vivo dadurch begrenzen, dass das freie Eisen im Serum auf sehr niedrige Konzentrationen gesenkt wird. Dafür sorgen Eisentransportproteine wie Transferrin, Ferritin, Häm oder Lactoferrin, die eine Eisenkonzentration von  $10^{-18}$ M aufrechterhalten. Transferrin als quantitativ bedeutendstes Eisentransportmolekül ist bei gesunden Individuen nur zu 30% gesättigt. Als Antwort auf eine Infektion wird durch unspezifische Abwehrmechanismen die Transferrinsättigung gesenkt und damit die Menge an verfügbarem Eisen erniedrigt. Es wurde gezeigt, dass *A. fumigatus* in der Lage ist, auch in einem Medium zu überleben,

das Konzentrationen humanen Serums enthält, welche normalerweise kein Wachstum erlauben [10], [11]. Dafür sind Siderophore verantwortlich, die es *A. fumigatus* erlauben, Transferrin-gebundenes Eisen verfügbar zu machen. Solche Hydroxamat-Siderophore sind beispielsweise Ferricrocin, Ferrichrom, Ferrichrom C, N',N'',N'''-triacetylfusarinin (TAF), wovon Ferricrocin und TAF die quantitativ bedeutsamsten von *A. fumigatus* produzierten Siderophore sind. Nicht nur *A. fumigatus* sondern auch einige Bakterienspezies sind in der Lage, Siderophore zu produzieren, so etwa *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio spp.* oder *Burkholderia cepacia*. Einige der Gene für die Siderophoren-Produktion zuständigen Gene wurden bereits identifiziert. Das entsprechende Gen bei *A. fumigatus*, SidA, kodiert für L-Ornithin-N<sup>5</sup>-oxygenase, das den ersten Schritt in der Hydroxamat-Synthese katalysiert. Da es im menschlichen Organismus keine Biosynthesepathways zur Siderophoren-Synthese gibt, stellen diese einen interessanten möglichen Therapieansatz dar.

Gleichzeitig könnte es jedoch auch möglich sein, durch den Nachweis des SidA-Gens ein PCR-Assay mit hoher Spezifität zu konstruieren. Hierzu wurden durch die Firma TIB MOLBIOL (Berlin) zwei Forward- und zwei Reverse-Primer zusammen mit einer Sonde entwickelt.

Forward-Primer:

SidA\_F ACgTCAAAGAAACgCTggAAg

SidA\_S TCATggTggCTACAggCTACAAT

Reverse-Primer:

SidA\_A CCCgTAggTCTGAAgTgTTgAAC

SidA\_R CTgTCCCgTAggTCTCAAgTgTT

Sonde:

SidA\_TM FAM-TTgCTCAggAgTCgCTCgTgCg-TMR

In mehreren Testläufen mit *Aspergillus*-Standards erwies sich die Kombination „SidA\_S“ mit „SidA\_R“ als die optimale.

Der verwendete Mastermix enthält:

|                 |      |        |
|-----------------|------|--------|
| - SidA_S-Primer | 10µM | 0,4 µl |
| - SidA_R-Primer | 10µM | 0,4 µl |
| - Sonde         | 1µM  | 1 µl   |
| - MgCl          | 3mM  | 1,2 µl |
| - Wasser        |      | 5 µl   |
| - Taq           |      | 2 µl   |

PCR-Temperaturprofil (Realtime-PCR-StandardEinstellung):

|               |      |        |
|---------------|------|--------|
| Denaturierung | 95°C | 10 min |
| Amplifikation | 95°C | 15 sec |
| (55 Zyklen)   | 55°C | 15 sec |
|               | 72°C | 15 sec |
| Cooling       | 40°C | 30 sec |

### **2.3.3 Platelia™ - Sandwich-ELISA**

Platelia™ *Aspergillus* EIA (Enzymimmunoassay) ist ein einstufiges „Sandwich“-EIA, das zum Nachweis von Galaktomannan (GM) in humanem Serum dient [13]. Galaktomannan ist ein Polysaccharid und wird als Bestandteil der Zellwand nur von *A. fumigatus*, nicht aber im menschlichen Organismus gebildet. Es stellt somit ein mögliches Antigen zur Detektion von *A. fumigatus* dar. Das Platelia™-EIA nutzt dazu einen monoklonalen Ratten-Antikörper (EBA-2), der gegen *Aspergillus*-GM gerichtet ist. Eine Mikrotiterplatte wird mit EBA-2 beschichtet (Festphase), während Peroxidase-gekoppelte EBA-2-Antikörper zum Nachweis des gebundenen Antigens dienen (Konjugatreagenz). Vor Durchführung des Tests werden die Serumproben gekocht, um Proteine auszufällen, die eventuell mit dem Test interferieren könnten sowie zur Dissoziation von Immunkomplexen. Bei Vorhandensein von GM bilden sich Komplexe aus den Festphase-MABs, GM und den mit Peroxidase konjugierten MABs.

Nach Zugabe einer Substratlösung findet eine Reaktion mit der Peroxidase statt, die zu einer Blaufärbung führt. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Säure gestoppt. Die optische Absorption von Proben und Kontrollen kann mit einem Spektrophotometer gemessen werden.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Einteilung der Patientengruppen**

Nach Erfassung der Patienten im Zeitraum vom 01. 06. 2007 bis zum 31. 10. 2007 erfolgte retrospektiv eine Einteilung in vier verschiedene Gruppen:

- Patienten mit gesicherter invasiver Aspergillose (IA)
- Patienten mit wahrscheinlicher IA
- Patienten mit möglicher IA
- Patienten ohne Hinweise für eine IA

Diese Einteilung erfolgte gemäß den Kriterien der EORTC, wie sie 2002 festgelegt wurden [8], entspricht also der dort festgelegten Einteilung in

- proven IA
- probable IA
- possible IA
- indeterminate

Die Zuordnung zu den jeweiligen Gruppen erfolgt anhand bestimmter mikroskopischer, klinischer, kultureller und serologischer Kriterien, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

#### Gesicherte IA nach EORTC-Kriterien („proven IA“)

Gefordert wird der direkte Nachweis von Pilzhyphen in einem Gewebebiopsat zusammen mit entsprechenden Gewebsalterationen oder der Nachweis von Pilzhyphen aus einer normalerweise sterilen Gewebe- und / oder Flüssigkeitsprobe, die von einem klinisch und radiologisch sichtbar krankhaft verändertem Areal steril gewonnen wurde. Wie bereits



erwähnt, gelingt ein solcher Nachweis in den seltensten Fällen bei noch lebenden Patienten sondern wird in der Regel post mortem geführt.

#### Wahrscheinliche IA nach EORTC-Kriterien („probable IA“)

Für diese Einteilung ist ein „host factor“, also Wirtsfaktor, ein mikrobiologisches Kriterium und eines der sogenannten klinischen „major“-Kriterien oder zwei „minor“-Kriterien zu erfüllen.

Zu den „**host factors**“ gehören:

- Neutropenie (definiert als  $<500$  Neutrophile/ $\text{mm}^3$ ) über mehr als 10 Tage in zeitlichem Bezug zum Beginn einer fungalen Erkrankung
- anhaltendes, antibiotikarefraktäres Fieber für mehr als 96 Stunden bei Risikopatienten
- längere Gabe von Corticosteroiden (mind. 0,3 mg/kg KG/Tag Prednison-Äquivalent für mehr als 3 Wochen)
- Körpertemperaturen von  $>38^\circ\text{C}$  oder  $<36^\circ\text{C}$  plus eine der folgenden Bedingungen: prolongierte Neutropenie ( $>10$  Tage); zurückliegender oder aktueller Einsatz von Immunsuppressiva in den letzten 30 Tagen; bewiesene oder wahrscheinliche IA während einer abgelaufenen Neutropeniephase; symptomatische AIDS-Erkrankung
- Anzeichen für eine Graft-versus-Host-Erkrankung (Graft-versus-host-disease, GvHD)  $>$  Grad 2

Die **mikrobiologischen Kriterien** umfassen unter anderem:

- positiver kultureller Nachweis von Schimmelpilzen aus Sputumproben oder BAL-Flüssigkeit.
- positiver kultureller Nachweis oder direkter mikroskopischer/zytologischer Nachweis von Schimmelpilz aus Sinusaspirat
- positives Ergebnis eines Antigennachweisverfahrens in einer BAL-Probe, einer Liquorprobe oder in  $>2$  Blutproben

Die **klinischen Kriterien**, die als „major“ klassifiziert sind, beinhalten u.a.:

- neu aufgetretenes „Halo-Sign“ oder „Air-crescent-sign“ in der Thorax-CT → Befall des unteren Respirationstraktes
- verdächtige radiologische Zeichen einer invasiven Infektion in den Nasennebenhöhlen (wie z. B. Erosionen der Sinuswand oder ausgedehnte Destruktionen des Schädelknochens) → Befall der Sinus
- radiologische Hinweise für eine Infektion des ZNS (v.a. intraparenchymatöse Hirn- oder Rückenmarksläsionen)

Zu den **klinischen Kriterien**, die als „minor“ gelten, zählen u. a.:

- Symptome einer Infektion des unteren Respirationstraktes wie Husten, Brustschmerzen, Hämoptyse, Dyspnoe; entsprechende Befunde in der körperlichen Untersuchung wie z. B. Pleurareiben, Pleuraerguss; jedes neue Infiltrat, das kein „major“-Kriterium erfüllt
- Symptome einer Infektion des oberen Respirationstraktes; Ulzerationen der Nasenschleimhaut, Epistaxis; periorbitale Schwellung; nekrotische Läsionen oder Perforation des harten Gaumens
- fokale neurologische Symptome (z. B. fokale Krampfanfälle, Hemiparese, Hirnnervenlähmungen); Persönlichkeitsveränderungen; Hinweise für eine Hirnhautreizung; Auffälligkeiten im Liquorbefund

Mögliche IA nach EORTC-Kriterien („possible IA“)

Die Zuordnung zu dieser Kategorie erfordert mindestens einen „host factor“ und ein mikrobiologisches Kriterium oder ein „major“ bzw. zwei „minor“-Kriterien.

Nach Auswertung der Krankenakten erfolgte eine retrospektive Zuordnung der insgesamt 43 Patienten zu einer der vier Gruppen.

Tabelle 6: Patienteneinordnung nach EORTC-Kriterien

| <b>EORTC-Kategorie</b> | <b>Zahl der Patienten</b> |
|------------------------|---------------------------|
| proven IA              | 0                         |
| probable IA            | 5                         |
| possible IA            | 10                        |
| indeterminate          | 28                        |

### 3.2 Ergebnisse der Verfahren

#### 3.2.1 Ergebnisse 18-S-PCR

Insgesamt wurden 408 Blutproben von 39 Patienten (24 „indeterminate“, 10 „possible“, 5 „probable“) mit dem 18S-PCR-Verfahren untersucht. Hierbei wurden nur Patienten erfasst, von denen mindestens drei Proben bearbeitet wurden. 126 dieser Proben fielen positiv aus (30,88%). Nach Patienten gestaffelt ergibt sich folgendes Bild:

|                                  |                      |
|----------------------------------|----------------------|
| 0 positiv ausgefallene Proben    | 7 Patienten (17,9%)  |
| Eine positiv ausgefallene Probe  | 9 Patienten (23,1%)  |
| Zwei positiv ausgefallene Proben | 3 Patienten (7,7%)   |
| Mehr als zwei positive Proben    | 20 Patienten (51,3%) |

Betrachtet man die Ergebnisse der 18S-PCR in den unterschiedlichen EORTC-Kategorien, zeigt sich folgendes:

#### „indeterminate“-Patienten:

- insgesamt bearbeitete Proben: 212
  - o davon positiv: 59 (27,8%)
  - o davon negativ: 153 (72,2%)
- Zahl der Patienten ohne positives 18S-PCR-Ergebnis: 6 (25%)
- Zahl der Patienten mit einem positiven Ergebnis: 5 (20,8%)

- Zahl der Patienten mit  $\geq 2$  positiven Ergebnissen: 13  
(54,2%)

Es fällt auf, dass bereits in der Untergruppe der Patienten mit geringer Wahrscheinlichkeit für eine invasive Aspergillose die Mehrheit der Patienten zwei oder mehr positive Ergebnisse zeigt. Hier zeigt sich eine wesentliche, bekannte Schwäche der 18S-PCR. Als panfungales Assay amplifiziert die 18S-PCR nicht nur DNA von *A. fumigatus* sondern detektiert auch andere Spezies. Dies erhöht naturgemäß das Auftreten von falsch positiven Ergebnissen. In einer früheren Studie hatten Rogers et al zwei Primer-Sets (18S und 28S) und drei Geräte (LightCycler® (Roche), TaqMan (Applied Biosystems) und Rotor-Gene (Corbett Research) verglichen und gezeigt, dass 18S-Assays auch in Abwesenheit von *A. fumigatus*-DNA eine gewisse Menge an humaner rDNA amplifizieren [22].

„possible“-Patienten:

- insgesamt bearbeitete Proben: 130
  - o davon positiv: 46 (35,38%)
  - o davon negativ: 84 (64,62%)
- Zahl der Patienten ohne positives 18S-Ergebnis: 1 (10%)
- Zahl der Patienten mit 1 positiven Ergebnis: 3 (30%)
- Zahl der Patienten mit  $\geq 2$  positiven Ergebnissen: 6 (60%)

In dieser Untergruppe mit höherer Wahrscheinlichkeit für eine IA fällt die Gesamtzahl positiver Proben höher aus als in der „indeterminate“-Gruppe, gleichzeitig ist in dieser Untergruppe nur ein Patient ohne positiven 18S-Befund zu finden.

„probable“-Patienten:

- insgesamt bearbeitete Proben: 68
  - o davon positiv: 21 (30,9%)
  - o davon negativ: 47 (69,1%)

- Zahl der Patienten ohne positives 18S-Ergebnis: 0
- Zahl der Patienten mit 1 positiven Ergebnis: 1 (20%)
- Zahl der Patienten mit  $\geq 2$  positiven Ergebnissen: 4 (80%)

Die mit 5 Patienten sehr kleine Gruppe von Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit für IA zeigte zwar insgesamt eine etwas kleinere Zahl an positiven Proben, jedoch waren bei 4 der 5 Patienten mehr als 2 Proben positiv ausgefallen.

Für alle folgenden Berechnungen wurde das Vorkommen von zwei oder mehr positiven Ergebnissen als „positives Testergebnis“ gewertet, war kein oder nur ein Ergebnis positiv, wurde dies als „negativ“ gewertet. Da in der vorliegenden Studie keine Patienten mit gesicherter IA einbezogen werden konnten, soll als Kompromiss die Untergruppe der „probable“-Patienten, also der Patienten mit hoher klinischer Wahrscheinlichkeit für eine IA jeweils den „indeterminate“-Patienten, die eine geringe Wahrscheinlichkeit für IA aufwiesen, gegenübergestellt werden.

|                    | „probable“-<br>Patienten | „indeterminate“-<br>Patienten | Summe |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------|-------|
| <b>18S positiv</b> | 4                        | 13                            | 17    |
| <b>18S negativ</b> | 1                        | 11                            | 12    |
| <b>Summe</b>       | 5                        | 24                            |       |

Hieraus errechnen sich Sensitivität und Spezifität wie folgt:

- Sensitivität 80 %
- Spezifität 45,8 %
- Positiver Vorhersagewert 23,5 %
- Negativer Vorhersagewert 91,6 %

Als panfungales Assay amplifiziert die 18S-PCR nicht nur *A. fumigatus* – DNA, sondern auch solche anderer, nicht-pathogener Pilze, wodurch sich die hohe Zahl von positiven Ergebnissen selbst bei solchen Patienten

erklärt, die nach EORTC-Kriterien als „indeterminate“ eingestuft wurden. Entscheidender Schwachpunkt, wie aus obigen Zahlen ersichtlich, ist die niedrige Spezifität von 45,8 %.

### **3.2.2 Ergebnisse der ITS-Real time-PCR:**

Mit dem ITS-Real-Time-PCR-Verfahren wurden 506 Proben von 43 Patienten untersucht. Diese teilen sich wie folgt nach EORTC-Kriterien auf: 28 „indeterminate“, 10 „possible“, 5 „probable“ und 0 „proven“.

Von den 506 Proben fielen 12 Proben positiv aus. 36 der Patienten hatten nie ein positives ITS-Ergebnis ( 83,7%), 3 hatten 1 positives Ergebnis (7%) und 4 hatten 2 oder mehr positive Ergebnisse (9,3%).

Auch hier wurden in den jeweiligen Untergruppen die Ergebnisse verglichen:

#### „indeterminate“-Gruppe:

- insgesamt untersuchte Proben: 288
  - o davon positiv: 4 (1,4%)
  - o davon negativ: 284 (98,6%)
- Zahl der Patienten ohne positives Ergebnis: 25 (92,6%)
- Zahl der Patienten mit 1 positiven Ergebnis: 2 (7,4%)
- Zahl der Patienten mit  $\geq 2$  pos. Ergebnissen: 1 (3,7%)

#### „possible“-Gruppe:

- insgesamt untersuchte Proben: 143
  - o davon positiv: 0
  - o davon negativ: 143
- Zahl der Patienten ohne positives Ergebnis: 10 (100%)

#### „probable“-Gruppe:

- insgesamt untersuchte Proben: 75
  - o davon positiv: 8 (10,6%)
  - o davon negativ: 67 (89,3%)
- Zahl der Patienten ohne positives Ergebnis: 1 (20 %)

- Zahl der Patienten mit 1 pos. Ergebnis: 1 (20 %)
- Zahl der Patienten mit  $\geq 2$  pos. Ergebnissen: 3 (60%)
- 

Im Vergleich zur „indeterminate“-Gruppe ist in der „probable“-Gruppe sowohl die Zahl der insgesamt positiv ausgefallenen Proben als auch die Zahl der Patienten mit mindestens 2 positiven Proben augenfällig höher.

Auch hier soll gelten, dass das Vorliegen von mindestens zwei positiven Ergebnissen als „positiv“ gilt, ein oder kein positives Ergebnis zählt als „negativ“.

|                | „probable“-<br>Patienten | „indeterminate“-<br>Patienten | Summe |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|-------|
| <b>positiv</b> | 3                        | 1                             | 4     |
| <b>negativ</b> | 3                        | 26                            | 29    |
| <b>Summe</b>   | 6                        | 27                            |       |

Hieraus würden sich folgende Werte für Sensitivität, Spezifität, positive bzw. negative Vorhersagewahrscheinlichkeit ergeben:

- Sensitivität: 75 %
- Spezifität: 89,6 %
- positiver prädiktiver Wert: 50 %
- negativer prädiktiver Wert: 96,3 %

### 3.2.3 Ergebnisse der SidA-Real-Time-PCR

Es wurden 48 Proben untersucht. Während in den Positivkontrollen positive PCR-Ergebnisse gefunden werden konnten (definiert durch das Auftreten von „crossing points“), fiel keine der untersuchten Patientenproben positiv aus. Auch bei Proben solcher Patienten, die in einigen oder allen anderen Untersuchungsverfahren positiv ausgefallen waren, konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Offenbar

liegen in Blutproben – auch in solchen von mutmaßlich an IA erkrankten Personen – zu geringe Mengen von SidA-Genkopien vor. Die Anwendung des SidA-Verfahrens wurde im weiteren Verlauf nicht mehr fortgesetzt.

### **3.2.4 Ergebnisse von Platelia™**

Mit dem Platelia™-Kit wurden 484 Patientenproben von 42 Patienten untersucht. Der Cut-off-Wert für einen positiv ausgefallenen Test wurde wie vom Hersteller angegeben bei einem Index von 0,5 angesetzt. Der Index wird durch den Quotienten aus dem OD-Wert (optische Dichte im Platereader) der Probe und der mittleren OD der Cut-off-Kontrollen errechnet.

Von allen Proben fielen 86 positiv aus (17,77%).

#### „indeterminate“-Gruppe (26 Patienten):

- insgesamt untersuchte Proben: 254
  - o davon positiv: 32 (12,6%)
  - o davon negativ: 222 (87,4%)
- Zahl der Patienten ohne positives Ergebnis: 10 (38,5%)
- Zahl der Patienten mit 1 pos. Ergebnis: 5 (19,2%)
- Zahl der Patienten mit  $\geq 2$  pos. Ergebnissen: 11 (42,3%)

#### „possible“-Gruppe (10 Patienten):

- insgesamt untersuchte Proben: 129
  - o davon positiv: 25 (19,4%)
  - o davon negativ: 104 (80,6%)
- Zahl der Patienten ohne positives Ergebnis: 3 (30%)
- Zahl der Patienten mit 1 pos. Ergebnis: 1 (10%)
- Zahl der Patienten mit  $\geq 2$  pos. Ergebnissen: 6 (60%)

#### „probable“-Gruppe (6 Patienten):

- insgesamt untersuchte Proben: 101
  - o davon positiv: 29 (28,7%)
  - o davon negativ: 72 (71,3%)



- Zahl der Patienten ohne positives Ergebnis: 0
- Zahl der Patienten mit 1 pos. Ergebnis: 0
- Zahl der Patienten mit  $\geq 2$  pos. Ergebnissen: 6 (100%)

Hier ist von allen untersuchten Verfahren der klarste Zusammenhang zwischen Infektionswahrscheinlichkeit und positiven Testergebnissen zu beobachten. Bei den Patienten mit möglicher und wahrscheinlicher IA finden sich signifikant mehr positive Ergebnisse und unter den „probable“-Patienten findet sich keiner ohne ein positives Ergebnis.

|                | „probable“-<br>Patienten | „indeterminate“-<br>Patienten | Summe |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|-------|
| <b>positiv</b> | 6                        | 11                            | 17    |
| <b>negativ</b> | 0                        | 15                            | 15    |
| <b>Summe</b>   | 6                        | 26                            |       |

Auch hier soll das Testergebnis „positiv“ bei zwei oder mehr positiv ausgefallenen Tests angenommen werden. So ergibt sich:

- Sensitivität: 100 %
- Spezifität: 57,7 %
- positiver prädiktiver Wert: 35,3 %
- negativer prädiktiver Wert: 100 %

Wie bereits erwähnt, häuften sich im Verlauf der Studie vorübergehend die positiven, vor allem hochpositiven Ergebnisse bei den Platelia™-Tests. Angesichts der zu der fraglichen Zeit ablaufenden Renovierungsmaßnahmen im Institut für Mikrobiologie der Universität Würzburg muss daher leider eine Kontamination mit Pilzsporen vermutet werden. Dies muss berücksichtigt werden, wenn man die insgesamt doch recht hohe Zahl von positiven Testergebnissen bei „indeterminate“-Patienten betrachtet, die die schlechte Spezifität und den niedrigen positiven prädiktiven Wert mitbedingen.

### 3.3. Ergebnisse für „indeterminate“-Patienten

Die Mehrheit der in die Studie eingeschlossenen Patienten wird nach den EORTC-Kriterien als „indeterminate“ eingruppiert, es liegt also nach klinischen Kriterien eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine IA vor.

*Tabelle 7: Patient V001, „indeterminate“*

| Alter      | Diagnose | Datum      | 18S         | ITS  | Platelia    |             |
|------------|----------|------------|-------------|------|-------------|-------------|
| 40/M       | AML      | 04.06.2007 |             | neg. | neg. (0,33) |             |
|            |          | 07.06.2007 |             | neg. | neg. (0,11) |             |
|            |          | 11.06.2007 |             | neg. | pos. (0,62) |             |
|            |          | 14.06.2007 |             | neg. | neg. (0,06) |             |
|            |          | 18.06.2007 |             | neg. | neg. (0,11) |             |
|            |          | 21.06.2007 |             | neg. | neg. (0,17) |             |
|            |          | 25.06.2007 |             |      | ∅           | ∅           |
|            |          | 28.06.2007 |             |      | neg.        | pos. (0,52) |
|            |          | 02.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,07) |             |
|            |          | 05.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,16) |             |
|            |          | 09.07.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,08) |             |
|            |          | 12.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,04) |             |
|            |          | 16.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,14) |             |
|            |          | 19.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,1)  |             |
|            |          | 23.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,08) |             |
|            |          | 26.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,33) |             |
|            |          | 30.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,06) |             |
|            |          | 02.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,05) |             |
|            |          | 06.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,07) |             |
|            |          | 09.08.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,06) |             |
| 13.08.2007 | pos.     | neg.       | neg. (0,05) |      |             |             |
| 16.08.2007 | pos.     | neg.       | neg. (0,35) |      |             |             |

Tabelle 8, Patient V002, „indeterminate“

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia             |
|-------|----------|------------|------|------|----------------------|
| 65/M  | AML      | 04.06.2007 |      | neg. | neg. (0,13)          |
|       |          | 07.06.2007 |      | neg. | neg. (0,11)          |
|       |          | 11.06.2007 |      | neg. | neg. (0,06)          |
|       |          | 14.06.2007 |      | neg. | pos./pos.(0,78/0,82) |
|       |          | 18.06.2007 |      | neg. | neg. (0,42)          |
|       |          | 21.06.2007 |      | neg. | neg. (0,09)          |
|       |          | 25.06.2007 |      | neg. | neg. (0,05)          |
|       |          | 28.06.2007 |      | neg. | neg. (0,05)          |
|       |          | 02.07.2007 | pos. | neg. | neg. (0,13)          |

Tabelle 9, Patient V003, „indeterminate“

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS             | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|-----------------|-------------|
| 49/M  | ALL      | 07.06.2007 |      | neg.            | neg. (0,11) |
|       |          | 11.06.2007 |      | neg.            | neg. (0,08) |
|       |          | 14.06.2007 |      | neg.            | neg. (0,12) |
|       |          | 18.06.2007 |      | neg.            | pos. (0,85) |
|       |          | 21.06.2007 |      | neg.            | neg. (0,27) |
|       |          | 25.06.2007 |      | neg.            | neg. (0,09) |
|       |          | 05.07.2007 | neg. | neg.            | neg. (0,06) |
|       |          | 09.07.2007 | neg. | neg.            | pos. (0,87) |
|       |          | 12.07.2007 | neg. | neg.            | neg. (0,06) |
|       |          | 16.07.2007 | neg. | neg.            | neg. (0,06) |
|       |          | 19.07.2007 | neg. | neg.            | neg. (0,22) |
|       |          | 23.07.2007 | neg. | neg.            | neg. (0,2)  |
|       |          | 26.07.2007 | pos. | pos.<br>(44,98) | neg. (0,23) |
|       |          | 30.07.2007 | pos. | neg.            | neg. (0,11) |

|  |  |            |      |      |                  |
|--|--|------------|------|------|------------------|
|  |  | 02.08.2007 | ∅    | ∅    | ∅                |
|  |  | 06.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,10/0,18) |
|  |  | 09.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,11)      |
|  |  | 13.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07)      |
|  |  | 16.08.2008 | neg. | neg. | neg. (0,12)      |
|  |  | 20.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06)      |

*Tabelle 10, Patient V005, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia             |
|-------|----------|------------|------|------|----------------------|
| 73/M  | AML      | 07.06.2007 |      | neg. | neg. (0,14)          |
|       |          | 11.06.2007 |      | neg. | neg. (0,15)          |
|       |          | 14.06.2007 |      | neg. | pos./neg.(1,15/0,07) |
|       |          | 18.06.2007 |      | neg. | pos. (1,06)          |
|       |          | 21.06.2007 |      | neg. | neg. (0,12)          |
|       |          | 25.06.2007 |      | neg. | neg. (0,12)          |
|       |          | 12.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07)          |
|       |          | 16.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09)          |
|       |          | 19.07.2007 | pos. | neg. | neg. (0,1)           |
|       |          | 23.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,18)          |
|       |          | 26.07.2007 | pos. | neg. | neg. (0,06)          |
|       |          | 30.07.2007 | pos. | neg. | neg. (0,06)          |
|       |          | 02.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06)          |
|       |          | 06.08.2007 | pos. | neg. | pos. (0,57)          |
|       |          | 09.08.2007 | pos. | neg. | pos. (0,65)          |
|       |          | 13.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,12)          |
|       |          | 17.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,157)         |
|       |          | 20.09.2007 | neg. | neg. | pos. (0,86)          |
|       |          | 24.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,46)          |
|       |          | 1.10.2007  | neg. | neg. | neg. (0,09)          |

*Tabelle 11, Patient V007, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 64/M  | AML      | 14.06.2007 |      | neg. | neg. (0,07) |
|       |          | 18.06.2007 |      | neg. | neg. (0,13) |
|       |          | 21.06.2007 |      | neg. | neg. (0,19) |
|       |          | 25.06.2007 |      | neg. | neg. (0,35) |
|       |          | 28.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 02.07.2007 | pos. | neg. |             |

*Tabelle 12, Patient V008, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 48/W  | ALL      | 25.06.2007 |      | neg. | neg. (0,06) |
|       |          | 28.06.2007 |      | neg. | neg. (0,12) |
|       |          | 02.07.2007 | pos. | neg. | neg. (0,1)  |
|       |          | 05.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,03) |
|       |          | 09.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,04) |
|       |          | 12.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 16.07.2007 | neg. | neg. | pos. (0,74) |
|       |          | 19.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |
|       |          | 02.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,05) |

*Tabelle 13, Patient V009, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 74/M  | AML      | 05.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,39) |
|       |          | 09.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,17) |
|       |          | 12.07.2007 | neg. | neg. |             |
|       |          | 16.07.2007 | neg. | neg. |             |

*Tabelle, Patient V012, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum | 18S | ITS | Platelia |
|-------|----------|-------|-----|-----|----------|
|-------|----------|-------|-----|-----|----------|

|      |     |            |      |      |             |
|------|-----|------------|------|------|-------------|
| 57/W | AML | 23.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,1)  |
|      |     | 27.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |
|      |     | 30.08.2007 |      | neg. | neg. (0,21) |
|      |     | 25.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |
|      |     | 29.10.2007 |      | neg. | neg. (0,07) |

*Tabelle 14, Patient V015, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose  | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia     |
|-------|-----------|------------|------|------|--------------|
| 63/M  | V. a. ALL | 03.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,11)  |
|       |           | 06.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,35)  |
|       |           | 10.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,22)  |
|       |           | 13.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,1)   |
|       |           | 17.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,087) |
|       |           | 20.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09)  |
|       |           | 24.09.2007 | neg. | neg. | pos. (0,59)  |
|       |           | 27.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,36)  |
|       |           | 01.10.2007 | pos. | neg. | pos. (2,67)  |
|       |           | 04.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,1)   |
|       |           | 08.10.2007 | pos. | neg. | kein Serum   |
|       |           | 11.10.2007 | neg. | neg. | pos. (3,32)  |
|       |           | 29.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07)  |

*Tabelle 15, Patient V018, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 56/M  | AML      | 08.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,29) |
|       |          | 11.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,13) |
|       |          | 15.10.2007 | neg. | neg. | pos. (0,57) |
|       |          | 18.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,37) |
|       |          | 22.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,17) |

|  |  |            |      |      |             |
|--|--|------------|------|------|-------------|
|  |  | 25.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,34) |
|  |  | 29.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,41) |

*Tabelle 16, Patient V020, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia     |
|-------|----------|------------|------|------|--------------|
| 57/W  | ALL      | 18.10.2007 | neg. | neg. | keine Proben |
|       |          | 22.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,07)  |
|       |          | 25.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,06)  |
|       |          | 29.10.2007 |      | neg. | neg. (0,05)  |

*Tabelle 17, Patient V021, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 46/W  | AML      | 18.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,1)  |
|       |          | 22.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |
|       |          | 25.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,05) |
|       |          | 29.10.2007 |      | neg. | neg. (0,05) |

*Tabelle 18, Patient SZ003, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose          | Datum      | 18S  | ITS              | Platelia             |
|-------|-------------------|------------|------|------------------|----------------------|
| 23/W  | Morbus<br>Hodgkin | 04.06.2007 |      | neg.             | neg. (0,06)          |
|       |                   | 07.06.2007 |      | neg.             | neg. (0,09)          |
|       |                   | 11.06.2007 |      | pos.(>46,<br>00) | neg. (0,16)          |
|       |                   | 14.06.2007 |      | neg.             | keine Proben         |
|       |                   | 18.06.2007 |      | neg.             | pos./neg.(3,59/0,21) |
|       |                   | 21.06.2007 |      | neg.             | keine Proben         |
|       |                   | 25.06.2007 |      | neg.             | keine Proben         |
|       |                   | 28.06.2007 |      | neg.             | keine Proben         |
|       |                   | 02.07.2007 | pos. | neg.             | ∅                    |

|  |  |            |      |      |                  |
|--|--|------------|------|------|------------------|
|  |  | 05.07.2007 | neg. | neg. | pos. (0,91)      |
|  |  | 09.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07/0,04) |
|  |  | 12.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,25)      |
|  |  | 16.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08)      |
|  |  | 19.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06)      |
|  |  | 23.07.2007 | neg. | neg. | keine Proben     |
|  |  | 30.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07)      |
|  |  | 03.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,06)      |
|  |  | 06.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,05)      |
|  |  | 10.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09)      |
|  |  | 13.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,14)      |

*Tabelle 19, Patient SZ004, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 53/W  | MM       | 04.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 07.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 11.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 14.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 18.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 21.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 25.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 28.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 09.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,07) |

*Tabelle 20, Patient SZ005, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S | ITS  | Platelia |
|-------|----------|------------|-----|------|----------|
| 56/M  | CLL      | 04.06.2007 |     | neg. | neg. (?) |
|       |          | 07.06.2007 |     | neg. | neg. (?) |
|       |          | 11.06.2007 |     | neg. | neg. (?) |



|  |  |            |  |      |              |
|--|--|------------|--|------|--------------|
|  |  | 14.06.2007 |  | neg. | keine Proben |
|--|--|------------|--|------|--------------|

*Tabelle 21, Patient SZ010, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia         |
|-------|----------|------------|------|------|------------------|
| 62/M  | MM       | 21.06.2007 |      | neg. | keine Proben     |
|       |          | 08.10.2007 | neg. | neg. | neg. (7,45/0,09) |
|       |          | 11.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,2)       |
|       |          | 15.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06)      |

*Tabelle 22, Patient SZ014, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S | ITS             | Platelia    |
|-------|----------|------------|-----|-----------------|-------------|
| 60/W  | AML      | 12.07.2007 |     | neg.            | neg. (0,09) |
|       |          | 16.07.2007 |     | neg.            | neg. (0,21) |
|       |          | 19.07.2007 |     |                 |             |
|       |          | 23.07.2007 |     | neg.            | neg. (0,33) |
|       |          | 26.07.2007 |     | neg.            | pos. (0,53) |
|       |          | 30.07.2007 |     | neg.            | neg. (0,07) |
|       |          | 02.08.2007 |     | pos.<br>(46,96) | neg. (0,1)  |
|       |          | 06.08.2007 |     | neg.            | neg. (0,12) |
|       |          | 27.08.2007 |     | neg.            | neg. (0,14) |
|       |          | 30.08.2007 |     | neg.            | neg. (0,12) |

*Tabelle 23, Patient SZ016, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 52/W  | MM       | 02.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,06) |
|       |          | 06.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,16) |
|       |          | 09.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,13) |
|       |          | 13.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |

|  |  |            |      |      |             |
|--|--|------------|------|------|-------------|
|  |  | 16.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,18) |
|  |  | 20.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08) |
|  |  | 23.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,14) |
|  |  | 27.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,11) |
|  |  | 30.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,1)  |
|  |  | 03.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,14) |
|  |  | 06.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,28) |

*Tabelle 24, Patient SZ018, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 30/M  | ALL      | 16.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08) |
|       |          | 20.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08) |
|       |          | 23.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 27.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,07) |
|       |          | 30.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06) |

*Tabelle 25, Patient SZ019, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia     |
|-------|----------|------------|------|------|--------------|
| 59/M  | AML      | 20.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,04)  |
|       |          | 23.08.2007 | neg. | neg. | pos. (0,68)  |
|       |          | 27.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,14)  |
|       |          | 30.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08)  |
|       |          | 03.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,16)  |
|       |          | 06.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,2)   |
|       |          | 10.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,1)   |
|       |          | 13.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,18)  |
|       |          | 17.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,097) |
|       |          | 15.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,27)  |
|       |          | 18.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,05)  |

|  |  |            |      |      |             |
|--|--|------------|------|------|-------------|
|  |  | 22.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,07) |
|  |  | 25.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,05) |
|  |  | 29.10.2007 |      | neg. | neg. (0,07) |

*Tabelle 26, Patient SZ020, „indeterminate“*

| Alter      | Diagnose | Datum      | 18S         | ITS  | Platelia     |
|------------|----------|------------|-------------|------|--------------|
| 32/W       | ALL      | 23.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,15)  |
|            |          | 27.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,08)  |
|            |          | 30.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,06)  |
|            |          | 03.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,07)  |
|            |          | 06.09.2007 | neg.        | neg. | pos. (1,66)  |
|            |          | 10.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,16)  |
|            |          | 13.09.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,16)  |
|            |          | 17.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,074) |
|            |          | 20.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,06)  |
|            |          | 24.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,08)  |
|            |          | 27.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,06)  |
|            |          | 01.10.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,07)  |
|            |          | 04.10.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,08)  |
|            |          | 08.10.2007 | neg.        | Ø    | kein Serum   |
|            |          | 11.10.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,14)  |
|            |          | 15.10.2007 | neg.        | neg. | pos. (0,96)  |
| 18.10.2007 | pos.     | neg.       | neg. (0,09) |      |              |
| 22.10.2007 | pos.     | neg.       | neg. (0,08) |      |              |

*Tabelle 27, Patient SZ023, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 60/M  | MDS      | 06.09.2007 | neg. | neg. |             |
|       |          | 10.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,11) |

|  |  |            |      |      |              |
|--|--|------------|------|------|--------------|
|  |  | 13.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,15)  |
|  |  | 17.09.2007 | neg. | neg. | pos. (4,993) |
|  |  | 20.09.2007 | neg. | neg. | pos. (8,15)  |
|  |  | 24.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08)  |
|  |  | 27.09.2007 | neg. | neg. | pos. (5,54)  |
|  |  | 01.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,11)  |
|  |  | 04.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,14)  |
|  |  | 08.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07)  |

*Tabelle 28, Patient SZ024, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 21/M  | MDS      | 10.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 13.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 17.09.2007 | neg. | neg. | pos. (8,44) |
|       |          | 20.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 24.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,13) |
|       |          | 27.09.2007 | pos. | neg. | pos. (7,88) |
|       |          | 01.10.2007 | pos. | neg. | pos. (2,89) |
|       |          | 29.10.2007 |      | neg. | neg. (0,03) |

*Tabelle 29, Patient SZ027, „indeterminate“*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 52/M  | MM       | 11.10.2007 | pos. | neg. | pos. (9,36) |
|       |          | 15.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,16) |
|       |          | 18.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06) |
|       |          | 22.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,05) |
|       |          | 25.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06) |
|       |          | 29.10.2007 |      | neg. | neg. (0,03) |

Tabelle 30, Patient SZ028, „indeterminate“

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 16/M  | AA       | 18.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06) |
|       |          | 22.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 25.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08) |
|       |          | 29.10.2007 |      | neg. | neg. (0,05) |

Tabelle 31, Patient MA001, „indeterminate“

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia    |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 21/M  | ALL      | 02.07.2007 | neg. | neg. | pos. (0,64) |
|       |          | 05.07.2007 | neg. | neg. | pos. (0,75) |
|       |          | 09.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,11) |
|       |          | 12.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |
|       |          | 16.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08) |
|       |          | 19.07.2007 |      |      |             |
|       |          | 23.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,28) |
|       |          | 26.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08) |
|       |          | 30.07.2007 | pos. | neg. | neg. (0,07) |
|       |          | 02.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,05) |
|       |          | 06.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,07) |
|       |          | 09.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08) |
|       |          | 13.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06) |

Tabelle 32, Patient R001, „indeterminate“

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia                 |
|-------|----------|------------|------|------|--------------------------|
| 75/W  | AML      | 15.10.2007 | neg. | neg. | pos. (0,56)              |
|       |          | 18.10.2007 | neg. | neg. | neg./pos.<br>(0,35/0,58) |
|       |          | 22.10.2007 | neg. | neg. | pos. (0,77)              |

|  |  |            |      |      |             |
|--|--|------------|------|------|-------------|
|  |  | 25.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|  |  | 29.10.2007 |      | neg. | neg. (0,05) |

### 3.4 Ergebnisse für „possible“- und „probable“-Patienten

Die für die Bewertung der einzelnen Verfahren besonders interessanten Patienten sind naturgemäß diejenigen, bei denen eine IA mit gewisser Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann. Patienten mit einer bewiesenen IA („proven“ im Sinne der EORTC-Kriterien) befanden sich nicht im untersuchten Kollektiv. Daher wird im folgenden das Augenmerk auf die Gruppe der als „possible“ und „probable“ Eingestufteten gerichtet werden, die 16 Personen umfasst (10 „possible“, 5 „probable“).

*Tabelle 33: Patient „V006“, „probable“, verstorben*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS         | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|-------------|-------------|
| 67/W  | AML      | 14.06.2007 |      | neg.        |             |
|       |          | 18.06.2007 |      | neg.        |             |
|       |          | 21.06.2007 |      | neg.        |             |
|       |          | 25.06.2007 |      | neg.        |             |
|       |          | 28.06.2007 |      | neg.        |             |
|       |          | 02.07.2007 | pos. | neg.        | neg. (0,13) |
|       |          | 05.07.2007 | neg. | neg.        | neg. (0,10) |
|       |          | 09.07.2007 | pos. | neg.        | neg. (0,05) |
|       |          | 12.07.2007 | pos. | pos.(41,54) | neg. (0,03) |
|       |          | 16.07.2007 | pos. | neg.        | neg. (0,06) |
|       |          | 19.07.2007 | neg. | neg.        | neg. (0,18) |
|       |          | 23.07.2007 | neg. | pos.(40,45) | pos. (0,7)  |

Bei dieser Patientin zeigt sich eine auffällige und überzufällige Häufung positiver Resultate nicht nur in der unspezifischen 18S-PCR sondern

auch im Platelia-Assay und vor allem zwei positive Ergebnisse in der ITS-PCR.

*Tabelle 34: Patient „V010“, „probable“, keine PBSCT*

| Alter      | Diagnose | Datum      | 18S         | ITS         | Platelia™    |
|------------|----------|------------|-------------|-------------|--------------|
| 52/W       | ALL      | 05.07.2007 | neg.        | neg.        | neg. (0,03)  |
|            |          | 09.07.2007 | pos.        | neg.        | neg. (0,23)  |
|            |          | 12.07.2007 | neg.        | pos.(41,58) | pos. (0,75)  |
|            |          | 16.07.2007 | pos.        | pos.(41,65) | pos. (1, 61) |
|            |          | 19.07.2007 | pos.        | pos.(43,01) | neg. (0,37)  |
|            |          | 23.07.2007 | neg.        | neg.        | neg. (0,3)   |
|            |          | 26.07.2007 | neg.        | neg.        | neg. (0,09)  |
|            |          | 30.07.2007 | pos.        | neg.        | neg. (0,44)  |
|            |          | 02.08.2007 | pos.        | neg.        | neg. (0,06)  |
|            |          | 06.08.2007 | pos.        | neg.        | neg. (0,08)  |
|            |          | 09.08.2007 | pos.        | neg.        | neg. (0,12)  |
|            |          | 13.08.2007 | pos.        | neg.        | neg. (0,28)  |
|            |          | 16.08.2007 | pos.        | neg.        | neg. (0,19)  |
|            |          | 20.08.2007 | pos.        | neg.        | neg. (0,24)  |
|            |          | 23.08.2007 | neg.        | neg.        | neg. (0,13)  |
|            |          | 27.08.2007 | neg.        | neg.        | neg. (0,08)  |
| 30.08.2007 | neg.     | neg.       | neg. (0,21) |             |              |

Auch hier fällt eine deutliche Häufung positiver Ergebnisse auf, insbesondere im Zeitraum zwischen dem 9.7.07 und dem 19.7.07 mit drei aufeinanderfolgenden positiven ITS-Ergebnissen und zeitgleich zwei positiven Platelia-Ergebnissen. Auffällig ist zudem, dass im Anschluss an diese Phase offensichtlich hoher Fungämie die Resultate der 18S-PCR noch über Wochen positiv bleiben, während die beiden anderen Untersuchungsmethoden durchweg negativ bleiben.

Tabelle 35: Patient „V012“, „probable“, keine PBSCT

| Alter      | Diagnose | Datum      | 18S         | ITS  | Platelia™    |
|------------|----------|------------|-------------|------|--------------|
| 69/M       | AML      | 16.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,12)  |
|            |          | 20.08.2007 | neg.        | neg. | pos. (3,68)  |
|            |          | 23.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,13)  |
|            |          | 27.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,09)  |
|            |          | 30.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,17)  |
|            |          | 03.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,07)  |
|            |          | 06.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,11)  |
|            |          | 10.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,07)  |
|            |          | 13.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,14)  |
|            |          | 17.09.2007 | neg.        | neg. | pos. (1,497) |
|            |          | 20.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,08)  |
|            |          | 24.09.2007 | neg.        | neg. | pos. (1,15)  |
|            |          | 27.09.2007 | neg.        | neg. | pos. (7,88)  |
|            |          | 01.10.2007 | neg.        | neg. | pos. (1,54)  |
|            |          | 04.10.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,12)  |
|            |          | 08.10.2007 | neg.        | neg. | pos. (1,5)   |
|            |          | 11.10.2007 | pos.        | neg. | pos. (8,87)  |
|            |          | 15.10.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,19)  |
| 18.10.2007 | pos.     | neg.       | neg. (0,15) |      |              |
| 22.10.2007 | neg.     | neg.       | neg. (0,13) |      |              |

Hier fällt nun eine deutliche Diskrepanz zwischen mehreren, zum sehr deutlich positiven Ergebnissen der Platelia-getesteten Proben und den durchweg negativen ITS-Tests auf, zudem ist selbst die 18S-PCR überwiegend negativ ausgefallen. Insbesondere die Platelia™-Testergebnisse vom 27.9. und 11.10. fallen um eine vielfaches höher aus als die übrigen Positiv-Ergebnisse. Da der ermittelte Wert in einem



direkten Verhältnis zur Fungämie steht, müssten diese Proben erhebliche Mengen *Aspergillus*-DNA enthalten haben, sodass auch positive Proben in den anderen Verfahren zu erwarten gewesen wären. Da dies nicht der Fall ist und sich zum selben Zeitpunkt extrem hohe Messwerte auch in Proben anderer Patienten, auch solcher mit niedriger Wahrscheinlichkeit für IA („indeterminate“) fanden, muss wohl am ehesten von einer Kontamination ausgegangen werden.

*Tabelle 36: Patient „SZ017“, „probable“, allogene PBSCT*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS         | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|-------------|-------------|
| 45/M  | ALL      | 06.08.2007 | neg. | neg.        | neg. (0,09) |
|       |          | 09.08.2007 | neg. | neg.        | neg. (0,1)  |
|       |          | 13.08.2007 | neg. | neg.        | neg. (0,07) |
|       |          | 16.08.2007 | neg. | neg.        | neg. (0,13) |
|       |          | 20.08.2007 | neg. | neg.        | neg. (0,05) |
|       |          | 23.08.2007 | neg. | neg.        | neg. (0,07) |
|       |          | 27.08.2007 | pos. | neg.        | neg. (0,1)  |
|       |          | 24.09.2007 | neg. | pos.(46,34) | neg. (0,09) |
|       |          | 27.09.2007 | neg. | neg.        | pos. (0,61) |
|       |          | 01.10.2007 | pos. | neg.        | pos. (0,82) |
|       |          | 18.10.2007 | pos. | neg.        | pos. (0,73) |
|       |          | 22.10.2007 | pos. | neg.        | neg. (0,11) |
|       |          | 25.10.2007 | pos. | neg.        | neg. (0,08) |
|       |          | 29.10.2007 |      |             | neg. (0,05) |

Auch bei diesem Patienten fällt ein Zeitraum mit gehäuften positiven Ergebnissen an allen drei Verfahren auf. Nach einem „peak“ zwischen dem 24.9. und dem 18.10. scheint die Fungämie zurückgegangen zu sein, höchstwahrscheinlich durch den prophylaktischen Einsatz von Antimykotika, wie er auf der Stammzelltransplantationseinheit üblich ist.

*Tabelle 37: Patient „SZ026“, „probable“, allogene PBSCT*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS         | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|-------------|-------------|
| 48/W  | MM       | 01.10.2007 | neg. | neg.        | neg. (0,42) |
|       |          | 04.10.2007 | neg. | neg.        | pos. (1,21) |
|       |          | 08.10.2007 | neg. | pos.(45,63) | pos. (6,69) |
|       |          | 11.10.2007 | neg. | pos.(40,63) | pos. (7,71) |
|       |          | 15.10.2007 | neg. | neg.        | pos. (2,27) |
|       |          | 18.10.2007 | neg. | neg.        | pos. (1,23) |
|       |          | 22.10.2007 | neg. | neg.        | pos. (1,46) |
|       |          | 25.10.2007 | pos. | neg.        | pos. (1,96) |
|       |          | 29.10.2007 |      | neg.        | pos. (2,48) |

Auch hier fallen die extrem hohen Werte des Platelia™-Assays auf. Wie erwähnt waren in einem Zeitraum von etwa vier Wochen auffällig viele Ergebnisse dieses Verfahrens sehr hoch ausgefallen, in diesen Zeitraum fallen auch die Ergebnisse dieser Patientin vom 8.10., 11.10. und 15.10. Die Werte ab dem 18.10. jedoch dürfen als valide gelten. Auffällig ist zudem der zweimalige positive Ausfall des ITS-PCR bei gleichzeitig fast ausschließlich negativem 18S-PCR-Ergebnis.

Zusammenfassend zeigt sich bei der Untergruppe der „probable“-Patienten eine deutliche Häufung positiver Ergebnisse im Platelia™-Assay und auch – besonders bei den Patienten V006, V010 und SZ026 – in der ITS-PCR, die wie erwähnt über alle Patientenproben hinweg betrachtet nur in 12 von 506 Fällen positiv ausfiel.

*Tabelle 38: Patient „V004“, „possible“, keine PBSCT*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S | ITS  | Platelia™   |
|-------|----------|------------|-----|------|-------------|
| 47/W  | AML      | 07.06.2007 |     | neg. | neg. (0,11) |
|       |          | 11.06.2007 |     | neg. | neg. (0,07) |

|  |  |            |      |      |             |
|--|--|------------|------|------|-------------|
|  |  | 14.06.2007 |      | neg. | neg. (0,04) |
|  |  | 18.06.2007 |      | neg. | neg. (0,36) |
|  |  | 21.06.2007 |      | neg. | neg. (0,39) |
|  |  | 25.06.2007 |      | neg. | neg. (0,03) |
|  |  | 28.06.2007 |      | neg. | neg. (0,15) |
|  |  | 02.07.2007 | neg. | neg. | -           |
|  |  | 24.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,13) |
|  |  | 27.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,16) |
|  |  | 01.10.2007 | neg. | neg. | pos. (0,59) |
|  |  | 04.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|  |  | 08.10.2007 | neg. | neg. | pos. (7,02) |
|  |  | 11.10.2007 | neg. | neg. | pos. (5)    |
|  |  | 15.10.2007 | neg. | neg. | pos. (1,61) |
|  |  | 18.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06) |
|  |  | 22.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,28) |
|  |  | 25.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,06) |

Außer einem zweimalig positiven Platelia™-Ergebnis – die einer Kontamination geschuldet sein dürften – fällt keine außergewöhnliche Häufung positiver Testergebnisse auf.

*Tabelle 39: Patient „V014“, „possible“, keine PBSCT, verstorben*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 67/W  | AML      | 30.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,13) |
|       |          | 03.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,18) |
|       |          | 06.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |
|       |          | 10.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06) |
|       |          | 13.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,1)  |
|       |          | 17.09.2007 | neg. | neg. | neg.(0,348) |

*Tabelle 40: Patient „V017“, „possible“, keine PBSCT*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 41/M  | ALL      | 20.09.2007 | neg. | neg. | pos. (3,02) |
|       |          | 24.09.2007 | neg. | neg. | pos. (0,58) |
|       |          | 27.09.2007 | neg. | neg. | pos. (2,29) |
|       |          | 01.10.2007 |      |      | pos. (0,65) |
|       |          | 04.10.2007 | pos. | neg. | pos. (1,87) |
|       |          | 08.10.2007 | pos. | neg. | pos. (7,51) |
|       |          | 11.10.2007 | pos. | neg. | pos. (1,7)  |
|       |          | 15.10.2007 | neg. | neg. | pos. (2,24) |
|       |          | 18.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,36) |
|       |          | 22.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,44) |
|       |          | 25.10.2007 | pos. | neg. | pos. (0,5)  |

Dieser Patient fällt durch eine hohe Zahl an teils sehr deutlich positiven Ergebnissen im Platelia™-Test auf. Jedoch finden sich positive Ergebnisse auch vor und nach dem Zeitraum, in den die vermutete Kontamination fiel. Daher darf von einer relevanten Fungämie ausgegangen werden, was sich auch in einigen positiven 18S-PCR-Ergebnissen widerspiegelt.

*Tabelle 41: Patient „V019“, „possible“, keine PBSCT*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 57/M  | AML      | 15.10.2007 | neg. | neg. | pos. (4,08) |
|       |          | 18.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,04) |
|       |          | 22.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,05) |
|       |          | 25.10.2007 | neg. | neg. | pos. (0,57) |
|       |          | 29.10.2007 |      | neg. | neg. (0,05) |

*Tabelle 42: Patient „SZ006“, „possible“, allogene PBSCT*

| Alter      | Diagnose | Datum      | 18S         | ITS  | Platelia™   |
|------------|----------|------------|-------------|------|-------------|
| 39/M       | MDS      | 02.07.2007 | neg.        | neg. | ∅           |
|            |          | 05.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,1)  |
|            |          | 09.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,04) |
|            |          | 12.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,11) |
|            |          | 16.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,27) |
|            |          | 19.07.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,18) |
|            |          | 23.07.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,2)  |
|            |          | 26.07.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,09) |
|            |          | 30.07.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,15) |
|            |          | 02.08.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,11) |
|            |          | 06.08.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,18) |
|            |          | 09.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,11) |
|            |          | 13.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,11) |
|            |          | 16.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,11) |
|            |          | 20.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,07) |
|            |          | 23.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,1)  |
|            |          | 27.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,16) |
|            |          | 30.08.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,37) |
|            |          | 03.09.2007 | neg.        | neg. | neg. (0,11) |
|            |          | 06.09.2007 | pos.        | neg. | neg. (0,13) |
| 10.09.2007 | neg.     | neg.       | neg. (0,41) |      |             |
| 13.09.2007 | neg.     | neg.       | neg. (0,09) |      |             |

Bei diesem Patienten, der über einen sehr langen Zeitraum erfasst wurde, finden sich lediglich einige positive Ergebnisse in der 18S-PCR, es fiel jedoch kein einziger Platelia™-Test positiv aus, ebensowenig eine ITS-PCR. Es dürfte also unwahrscheinlich sein, dass eine relevante Fungämie bestand.

Tabelle 43: Patient „SZ009“, „possible“, allogene PBSCT

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 43/M  | AML      | 18.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 21.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 25.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 28.06.2007 |      | neg. |             |
|       |          | 02.07.2007 | neg. | neg. | Ø           |
|       |          | 05.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 09.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,02) |
|       |          | 12.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,05) |
|       |          | 16.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,11) |
|       |          | 19.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 23.07.2007 | neg. | neg. | Ø           |
|       |          | 27.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 01.10.2007 | pos. | neg. | pos. (3,06) |

Patient 44, „SZ013“, „possible“, allogene PBSCT

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 35/W  | AML      | 02.07.2007 | neg. | neg. | Ø           |
|       |          | 05.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,04) |
|       |          | 09.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,04) |
|       |          | 12.07.2007 | pos. | neg. | neg. (0,05) |
|       |          | 16.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,05) |
|       |          | 19.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |
|       |          | 23.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 20.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,15) |
|       |          | 23.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,1)  |
|       |          | 27.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,15) |
|       |          | 30.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,08) |

|  |  |            |      |      |             |
|--|--|------------|------|------|-------------|
|  |  | 03.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,17) |
|  |  | 06.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,28) |
|  |  | 10.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,07) |
|  |  | 13.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,23) |
|  |  | 17.09.2007 | neg. | neg. | pos. (3,79) |
|  |  | 20.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08) |
|  |  | 24.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,41) |
|  |  | 27.09.2007 | pos. | neg. | pos. (7,88) |
|  |  | 01.10.2007 | pos. | neg. | pos. (2,97) |
|  |  | 4.10.2007  | neg. | neg. | -           |
|  |  | 8.10.2007  | neg. | neg. | pos. (4,57) |
|  |  | 11.10.2007 | pos. | neg. | pos. (6,72) |

*Tabelle 45: Patient „SZ015“, „possible“, allogene PBSCT*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 37/W  | B-ALL    | 12.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,1)  |
|       |          | 16.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,24) |
|       |          | 19.07.2007 |      |      |             |
|       |          | 23.07.2007 | neg. | neg. | (0,11/0,19) |
|       |          | 26.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,12) |
|       |          | 30.07.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06) |
|       |          | 02.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,15) |
|       |          | 06.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 25.10.     |      | neg. | neg. (0,21) |

*Tabelle 46, Patient „SZ021“, „possible“, allogene PBSCT*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 55/M  | ALL      | 27.08.2007 | pos. | neg. | neg. (0,11) |
|       |          | 30.08.2007 | neg. | neg. | neg. (0,08) |

|  |  |            |      |      |             |
|--|--|------------|------|------|-------------|
|  |  | 03.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |
|  |  | 06.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,06) |
|  |  | 10.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|  |  | 13.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,19) |
|  |  | 17.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,18) |
|  |  | 20.09.2007 | pos. | neg. | pos. (6,8)  |
|  |  | 24.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,28) |
|  |  | 01.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,48) |
|  |  | 04.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,12) |
|  |  | 08.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,27) |
|  |  | 11.10.2007 | pos. | neg. | pos. (1,61) |
|  |  | 15.10.2007 | pos. | neg. | pos. (0,73) |

Hier zeigt sich eine Häufung positiver Testresultate gegen Ende des Beobachtungszeitraums. Durch einen zweimaligen positiven Platelia™-Test in Verbindung mit mehrfach positivem 18S-PCR erscheint es möglich, dass der Patient im Verlauf eine Fungämie entwickelte, die dann auch durch das klinische Bild zu einer Kategorisierung als „possible“ geführt haben mag.

*Tabelle 47, Patient „SZ022“, „possible“, allogene PBSCT*

| Alter | Diagnose | Datum      | 18S  | ITS  | Platelia™   |
|-------|----------|------------|------|------|-------------|
| 62/W  | MDS      | 03.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,08) |
|       |          | 06.09.2007 | pos. | neg. | neg. (0,29) |
|       |          | 10.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,09) |
|       |          | 13.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,1)  |
|       |          | 17.09.2007 | neg. | neg. | pos. (8,44) |
|       |          | 20.09.2007 | pos. | neg. | pos. (7,63) |
|       |          | 24.09.2007 | pos. | neg. | pos. (0,56) |
|       |          | 27.09.2007 | neg. | neg. | neg. (0,15) |



|  |  |            |      |      |             |
|--|--|------------|------|------|-------------|
|  |  | 01.10.2007 | pos. | neg. | pos. (3,7)  |
|  |  | 4.10. 2007 | pos. | neg. | neg. (0,1)  |
|  |  | 8.10.2007  | pos. | neg. | neg. (0,1)  |
|  |  | 11.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,15) |
|  |  | 15.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,21) |
|  |  | 18.10.2007 | neg. | neg. | neg. (0,07) |
|  |  | 22.10.2007 | pos. | neg. | neg. (0,08) |

#### 4. Diskussion

Mit einer Zunahme der Organ- und Knochenmarkstransplantationen einerseits sowie der Entwicklung immer neuer Immunsuppressiva mit teils sehr subtiler Wirkweise andererseits ist auch die Inzidenz der invasiven Mykosen über die letzten Jahrzehnte sukzessive angestiegen (D W Warnock, 2007). Die Notwendigkeit einer frühestmöglichen und spezifischen Diagnose ergibt sich aus der hohen Mortalität der invasiven Pilzinfektionen und nicht zuletzt aus den häufig zu beobachtenden Nebenwirkungen und erheblichen Kosten einer prophylaktischen antimykotischen Therapie. Durch eine frühzeitige sichere Diagnosestellung kann, wie gezeigt wurde, die Mortalität invasiver Pilzinfektionen deutlich gesenkt werden (Kontoyannis D P, Marr K A, 2009).

Die Ansätze zur Frühdiagnose sind zahlreich und wurden in den vergangenen Jahrzehnten intensiv durch Studien erforscht und verglichen. Bisher konnte sich jedoch keine Methode als Standard etablieren. Die Anforderungen an ein Diagnoseverfahren sind a) hohe Sensitivität und Spezifität, b) vertretbare Kosten, c) Praktikabilität in der Durchführung und d) gute Verfügbarkeit. Bisher kann keines der existierenden Verfahren alle diese Voraussetzungen erfüllen.

Seit längerem schon sind Antigen-Tests zur Erkennung von Galactomannan (Platelia®, Bio-Rad, Hercules, CA; USA) bzw. Beta-D-

Glucan (Fungitell™, Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA; USA) im Handel. Die Einschränkungen, denen diese Tests unterliegen, sind durch zahlreiche Einflussfaktoren bedingt: Grunderkrankung des Patienten, Begleiterkrankungen, antimykotische Therapie, ja sogar bestimmte Nahrungsmittel (Hope W W, Walsh T J, Denning D W 2005). Als vielversprechendste Methode zur Frühdiagnostik ist bereits seit mehreren Jahren die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Zentrum umfassender Forschungsbemühungen. Dass sich die PCR bislang nicht als Verfahren der ersten Wahl durchsetzen konnte, liegt auch zu einem großen Teil an der fehlenden Standardisierung der Methoden zur DNA-Extraktion. Es wurde durch die EAPCRI (European Aspergillus PCR Initiative) kürzlich eine Empfehlung zur Verfahrensstandardisierung herausgegeben, die ein wichtiger Schritt zur Etablierung der PCR sein dürfte (White et al. 2010).

Verschiedene PCR-Methoden (konventionelle PCR mit Gelelektrophorese, „nested“-PCR, Real-Time-PCR) mit unterschiedlichsten Ziel-Genregionen (CYP-450, 5.8S, 28S, 18S, internal transcribed spacers, Hitzeschock-Proteine) wurden schon entwickelt und in Studien getestet [9]. Eine bereits seit längerem eingeführte PCR-Methode ist die im Folgenden der Einfachheit halber „18S-Methode“ benannte Methode, bei der eine hochkonservierte Region des für die 18s-Ribosomenuntereinheit codierenden rRNA-Gens repliziert wird. Dieses Gen liegt als multicopy-Gen vor, weswegen schon kleine Mengen fungaler DNA ausreichen, um ein positives Ergebnis zu erzielen. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Serumproben auch mit der 18s-Methode bearbeitet. Die Ergebnisse konnten „positiv“ oder „negativ“ ausfallen. Von insgesamt 408 Proben fielen 126 positiv aus. Bei den Patienten, welche als „indeterminate“ eingestuft worden waren, waren zwar insgesamt nur 58 Proben (27,5%) positiv, jedoch fanden sich in diesem Kollektiv immer noch bei 13 von 24 Patienten zweimal oder öfter positive Ergebnisse in

der 18s-PCR. Im Kollektiv der als „possible“ respektive „probable“ eingestuften Patienten steigt erwartungsgemäß der Anteil der positiven 18s-PCR-Ergebnisse an, die Zahl der Patienten ohne ein einziges positives Ergebnis nimmt stetig ab. Insgesamt jedoch ist bei einem Anteil von 75% aller Patienten mit falsch-positiven 18s-PCR-Ergebnissen (d.h. mindestens ein positives Ergebnis bei einem „indeterminate“-Patienten) eine erhebliche Einschränkung dieser Methode deutlich. Es liegt – wenn angenommen wird, dass „indeterminate“ mit „kein Vorliegen einer invasiven Aspergillose“ gleichgesetzt werden kann – eine zufriedenstellende Sensitivität von 93% vor, jedoch nur eine Spezifität von 25%. Die Eigenschaft des 18S-Gens als „multicopy“-Gen erweist sich als vorteilhaft für die Sensitivität, die Tatsache allerdings, dass es sich um ein panfungales Assay handelt, bedingt die äußerst geringe Spezifität. Auf diese Einschränkungen wurde schon in vorangegangenen Arbeiten hingewiesen [9].

In dieser Arbeit wurde außerdem mit dem SidA-Gen eine neue mögliche Zielregion für die PCR-Diagnostik ins Auge gefasst. Dieses Gen kodiert für L-Ornithin-N<sup>5</sup>-Oxygenase, ein Enzym im Eisenstoffwechsel von *A. fumigatus*. Da im menschlichen Organismus keine Siderophore synthetisiert werden, stellt das SidA-Gen eine interessante Target-Region für PCR dar, da mit einer hohen Spezifität gerechnet werden kann. Im Gegensatz zu 18S ist SidA jedoch kein multicopy-Gen. Dies schränkt die Verwertbarkeit als Zielregion für eine PCR-Diagnostik erheblich ein, wie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten. Mit den im entsprechenden Kapitel genauer beschriebenen Primern und der Sonde war in Testläufen in der Real-Time-PCR mithilfe von Positivproben der Nachweis von *A. fumigatus*-DNA gelungen, jedoch erst bei hohen CFU-Konzentrationen von 10<sup>5</sup> / ml. Bei keinem der als „probable“ oder „possible“ eingestuften Patienten gelang mit der SidA-PCR ein positives Ergebnis. Es hat sich zusammenfassend die prinzipielle Eignung des

SidA-Gens als Zielgen erwiesen. Jedoch dürfte seine Eigenschaft als single-copy-Gen einen klinischen Einsatz verunmöglichen. Allerdings wäre eine genauere Untersuchung mit einer größeren Anzahl an Proben, vor allem Proben von Patienten mit gesicherter IA (die für die vorliegende Arbeit nicht vorlagen) eventuell interessant.

Eine der am häufigsten untersuchten und mittlerweile gut etablierten Optionen für die PCR sind die ITS-Regionen (internal transcribed spacer). Diese artspezifischen, nicht-kodierenden rRNA-Abschnitte liegen wie die 18S-rRNA-Abschnitte, die sie einfassen, in vielen Kopien vor. Dies macht sie zumindest theoretisch zu einem Target, das gleichermaßen hohe Sensitivität als auch hohe Spezifität verspricht. In einer großangelegten Studie von Cuenca-Estrella et al von 2004/05 mit insgesamt 2244 Serumproben von 83 Patienten wurden für die Real-Time-PCR mit ITS1 als Zielregion eine Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver und negativer prädiktiver Wert von 91,6%, 94,4%, 73,3% bzw. 98,5% ermittelt [29]. In der vorliegenden Studie sind Spezifität und NPV mit 89,6 % bzw. 96,3 % vergleichbar, Sensitivität und PPV stehen jedoch mit 75 % bzw. 50 % deutlich zurück. Der Grund hierfür mag auch darin begründet liegen, dass von allen untersuchten Patienten keiner an einer bewiesenen invasiven Aspergillose litt. Auch Interaktionen mit bestehender antimykotischer Therapie sind möglich. Begleitende prophylaktische antimykotische Therapie, wie sie bei immunsupprimierten Patienten auf Stammzelltransplantationseinheiten üblich ist, wurde hier nicht erfasst, in weiteren Studien sollte dies erfolgen, um mögliche Interaktionen herauszustellen.

Als letztes Verfahren wurde das bereits gut etablierte Platelia®-Assay untersucht. Wie bereits erwähnt, muss eine vorübergehende Kontamination durch Schimmelpilzsporen angenommen werden, die für einige falsch-positive Ergebnisse verantwortlich zeichnet. Abseits solcher vermeidbarer Außeneinflüsse ist bereits die Beeinflussbarkeit des

Platelia®-Assays durch Begleitmedikation bekannt, z. B. bestimmte Antibiotika wie Amoxicillin+Clavulansäure (Augmentan®) [31] oder Piperacillin+Tazobactam (Tazobac®) [32]. In zahlreichen Arbeiten wurde bereits der Wert des Nachweises von Galactomannan zur Diagnostik der IA festgestellt, so etwa durch Lombardi et al [33] oder Sulahian [34]. In letztgenannter Arbeit wurde der Anstieg des GM-Titers in zwei aufeinander folgenden Seren als gut geeignet erachtet, die Diagnose einer IA zu ermöglichen. Eine frühe Arbeit von Maertens et al befasste sich mit seriell untersuchten Serumproben neutropener und allogent Stammzelltransplantierten Patienten. Hier konnte durch eine genauere Risikostratifizierung die empirische antifungale Therapie um 78% reduziert werden [35]. In einer weiteren, prospektiven Studie aus dem Jahr 2005 konnten Maertens et al zeigen, dass durch eine kombinierte serologische (Platelia®) und radiologische Diagnostik (Computertomographie) die antifungale Therapie zielgerichteter angewendet werden kann, wodurch der Einsatz teurer und oftmals nebenwirkungsreicher Antimykotika reduziert werden kann [36]. Das Galactomannan-ELISA wurde von der FDA zugelassen und ist auch Teil der EORTC-Kriterien. In der vorliegenden Arbeit bestätigt sich die beschriebene hohe Sensitivität des Tests. Bei den untersuchten Patienten der Gruppe „probable“ fand sich kein Patient ohne positives Platelia®-Ergebnis, die Mehrheit von ihnen hatte sogar zwei oder mehr aufeinander folgende positive Ergebnisse. Etwas getrübt wird das Ergebnis durch die eher mäßige Spezifität von 57,7%, die aber – wie erwähnt – sich aus der vermuteten Kontamination erklären dürfte.

Von den in die Arbeit eingeschlossenen Verfahren weist Platelia® mithin die höchste Sensitivität und den höchsten negativen prädiktiven Wert auf. Die höchste Spezifität wird – trotz der oben genannten Einschränkungen – durch die ITS-Real-Time-PCR erreicht. Möglicherweise ergibt sich also aus der Kombination von ITS-PCR und Galactomannan-Assay eine

vielversprechende Möglichkeit zur Frühdiagnostik der invasiven Aspergillose.

## **5. Zusammenfassung**

Die untersuchten Methoden umfassten eine konventionelle PCR als panfugales Assay, zwei Real-time-PCR mit verschiedenen Zielregionen (ITS und SidA) und ein Enzym-Immunoassay.

Das konventionelle PCR-Verfahren stellte sich als unzureichend zur Diagnostik der invasiven Aspergillose heraus, da es eine ausgesprochen niedrige Spezifität aufweist und viele falsch positive Ergebnisse erbrachte. Die PCR mit der 18s-Zielregion spielt aus diesen Gründen keine Rolle mehr in der Diagnostik.

Die SidA-Real-Time-PCR wurde ebenfalls im Rahmen der Arbeit getestet. Obwohl diese im Prinzip einen vielversprechenden Ansatz darstellt, da der menschliche Organismus keine Biopathways zur Siderophoren-Synthese besitzt und hier ein potentiell sehr spezifischer Nachweis von *A. fumigatus* möglich scheint, erwies sich die entsprechende PCR nicht als praktikabel. Selbst in Proben solcher Patienten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an invasiver Aspergillose erkrankt waren und bei welchen mit anderen Nachweisverfahren mehrere positiv ausgefallene Ergebnisse festgestellt wurden, war die SidA-PCR negativ, lediglich in Positivkontrollen mit sehr hoher Zahl von CFU gelang ein Nachweis, was jedoch die prinzipielle Möglichkeit des *A.fumigatus*-Nachweis über SidA illustriert.

Die ITS-PCR wies eine hohe Spezifität auf bei eingeschränkter Sensitivität. Im untersuchten Patientenkollektiv fand sich kein Patient, bei welchem nach den EORTC-Kriterien eine invasive Aspergillose als „proven“ galt, was die im Vergleich zu größeren Studien niedrigere Sensitivität mit erklären könnte. PCR-Assays mit den ITS-Regionen als Zielregionen sind Gegenstand fortdauernder Forschung Sie finden als

Nachweisverfahren nach wie vor Verwendung und werden möglicherweise bald Teil der EORTC-Kriterien zur IA-Diagnostik werden. Das Enzym-Immunoassay Platelia™ zeigte eine hohe Sensitivität, ist zudem bereits gut etabliert und weit verbreitet. Als einziges untersuchtes Verfahren ist es bereits Teil der EORTC-Kriterien. Ein bekannter Störfaktor ist seine Beeinflussung durch diverse Antibiotika.

## 6. Verwendete Literatur

- (1) Hof, Dörries – Medizinische Mikrobiologie, 2. Korrigierte Auflage, Thieme-Verlag Stuttgart, 2002
- (2) Morgan, J; Wannemuehler, K A; Hadley, S; Kontoyiannis, D P; Walsh, T J; Fridkin, S K; Pappas, P G; Warnock, D W – Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Medical mycology*, 43 Suppl 1, 2005, p 49-58
- (3) Martino, Rodrigo; Subirá, Maricel; Rovira, Montserrat; Solano, Carlos; Vázquez, Lourdes; Sanz, Guillermo F et al. (2002): Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients. In: *British journal of haematology*, Jg. 116, H. 2, S. 475–482.
- (4) Marr, Kieren A; Carter, Rachel A; Boeckh, Michael; Martin, Paul; Corey, Lawrence (2002): Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. In: *Blood*, Jg. 100, H. 13, S. 4358–4366. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2002-05-1496.
- (5) Pagano, Livio; Caira, Morena; Candoni, Anna; Offidani, Massimo; Fianchi, Luana; Martino, Bruno et al. (2006): The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. In: *Haematologica*, Jg. 91, H. 8, S. 1068–1075.
- (6) Kasper, Dennis L.; Harrison, Tinsley Randolph (2005): *Harrison's principles of internal medicine*. 16. ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical Pub. Division.
- (7) Greene, Reginald E; Schlamm, Haran T; Oestmann, Jörg-W; Stark, Paul; Durand, Christine; Lortholary, Olivier et al. (2007): Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. In: *Clinical infectious diseases* : an



- official publication of the Infectious Diseases Society of America, Jg. 44, H. 3, S. 373–379.
- (8) Ascioğlu, S; de Pauw, B E; Donnelly, J P; Collette, L (2001): Reliability of clinical research on invasive fungal infections: a systematic review of the literature. In: Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology, Jg. 39, H. 1, S. 35–40.
- (9) Einsele, H; Loeffler, J (2008): Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients. In: Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Jg. 14 Suppl 4, S. 37–45.
- (10) Hissen, Anna H T; Wan, Adrian N C; Warwas, Mark L.; Pinto, Linda J.; Moore, Margo M. (2005): The *Aspergillus fumigatus* siderophore biosynthetic gene *sidA*, encoding L-ornithine N5-oxygenase, is required for virulence. In: Infection and immunity, Jg. 73, H. 9, S. 5493–5503.
- (11) Hissen, A. H T; Chow, J. M T; Pinto, L. J.; Moore, M. M. (2004): Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. In: Infection and immunity, Jg. 72, H. 3, S. 1402–1408.
- (12) Latgé, J P (1999): *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. In: Clinical microbiology reviews, Jg. 12, H. 2, S. 310–350.
- (13) Chih-Cheng Lai, Hsiao-Leng Hsu, Li-Na Lee, Po-Ren Hsueh: Assessment of Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis; J Microbiol Immunol Infect 2007;40:148-153
- (14) Kawazu, Kanda, Nannya, Aoki, Kurokawa, Chiba, Motokura, Hirai, Ogawa: Prospective comparison of the diagnostic potential of Real-Time-PCR, double-Sandwich ELISA for Galactomannan, and

- a (1,3)- $\beta$ -D-Glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders; *J of Clin Microbiol*, June 2004, p. 2733-2741
- (15) Tuon, F.F.: A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Mycol*, 2007. **24**(2): S. 89-94
- (16) Klingspor L. and Jalal S.: Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*, 2006. **12**(8): S. 745-753
- (17) Rickerts V. et al: Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by semi-nested PCR assay of tissue samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006. **25**(1): S. 8-13
- (18) Lau A. et al: Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(2): S. 380-385
- (19) Hope W. W., Denning D. W.: Invasive aspergillosis: current and future challenges in diagnosis and therapy. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10; 2-4
- (20) Chen SC, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol* 2002; 40: 333-57
- (21) Rickerts V, Mousset S, Lambrecht E et al: Comparison of histopathological analysis to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1078-83
- (22) White PL, Barton R, Guiver M et al: A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom – Ireland

- evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn* 2006; 8: 376-84
- (23) Kontoyiannis, D. P., and K. A. Marr. 2009. Therapy of invasive aspergillosis: current consensus and controversies, p. 491–502. *In* J.-P. Latge and W. J. Steinbach (ed.), *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. ASM Press, Washington, DC.
- (24) Warnock D W: Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 48 1-12, 2007
- (25) Caillot, D., J. F. Couaillier, A. Bernard, O. Casasnovas, D. W. Denning, L. Mannone, J. Lopez, G. Couillault, F. Piard, O. Vagner, and H. Guy. 2001. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J. Clin. Oncol.* **19**:253–259.
- (26) Hope W W, Walsh T J, Denning D W: Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005 Oct;5(10):609-22.
- (27) White L. et al: *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *Journal of clinical microbiology*, Apr 2010, 1231-1240.
- (28) Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, Luis Hernando F, Pontón J, Garaizar J, Rementeria A.: What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 2010 Dec 31;27(4):155-82. Epub 2010
- (29) Cuenca-Estrella M, Yolanda M, Diaz-Pedroche C, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Grande C, San Juan R, Lizasoain M, Rodriguez-Tudela JL, Aguado JM: Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *Journal of Clinical Microbiology*, Feb 2009, p. 379-384

- (30) Schabereiter-Gurtner, C., et al., Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* specimens. *J Clin Microbiol*, 2007. 45(3): p. 906-14
- (31) Zandijk E, Mewis A, Magerman K, Cartuyvels R., False-positive results by the platelia *Aspergillus galactomannan* antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Jul;15(7):1132-3. Epub 2008 May 7.
- (32) Sulahian, A., S. Touratier and P. Ribaud, False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N Engl J Med*, 2003. 349(24): p. 2366-7
- (33) Lombardi, G., et al., Multicenter evaluation of an enzyme immunoassay (Platelia *Aspergillus*) for the detection of *Aspergillus* antigen in serum. *Mycopathologia*, 2002. 155(3): p. 129-33
- (34) Sulahian, A., et al., Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*, 2001. 91(2): p. 311-8
- (35) Maertens, J.A., et al., 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*, 2001. 97(6): p. 1604-10.
- (36) Maertens, J., et al., Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis*, 2005. 41(9): p. 1242-50

## 7. Bildnachweis

Abbildung 1: <http://www.radiology.rsna.org/content-nwfull2463697F24>

Abbildung 2: - [http://www.residentandstaff.com/issues/images2008-012008-01\\_06-02.jpg](http://www.residentandstaff.com/issues/images2008-012008-01_06-02.jpg)

Abbildung 3: [www.cobas.at](http://www.cobas.at)

Abbildung 4: [www.ijm2.ijm.jussieu.fr](http://www.ijm2.ijm.jussieu.fr)

Abbildung 5: [edoc.hu-berlin.de](http://edoc.hu-berlin.de)

## **Danksagung**

Ich danke allen Mitarbeitern aus dem Haus C11, die mich bei der Durchführung der diagnostischen Methoden unterstützt haben; Simon für die Hilfe beim stundenlangen Aktenstudium; Rainer für seine humorvoll-spöttischen Kommentare.

Der größte Dank gebührt Jürgen Löffler, der viel dazu beigetragen hat, dass diese Arbeit fertiggestellt wurde.

## **Lebenslauf**

**Name:** Marcel Bernhardt

**geboren:** 26. November 1981 in Kösching

**Eltern:** Wolfgang und Regina Bernhardt

### **Schullaufbahn:**

- 1988 – 1992: Grundschule Auf der Schanz Ingolstadt
- 1992 – 2001: Reuchlin-Gymnasium Ingolstadt, Abitur 2001

**Zivildienst:** 2001 – 2002 Klinikum Ingolstadt

### **Hochschullaufbahn:**

- 2002 – 2004: Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main, Physikum 2004
- 2004 – 2009: Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Staatsexamen 2009

### **Berufslaufbahn:**

- seit 2009: Klinikum Ingolstadt, Medizinische Klinik II (Prof. Menzel)