Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

Etablierung und Evaluation der NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)-Technologie zum Nachweis von Aspergillus-RNA

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Philipp Cox

aus

Tübingen

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

1.1. Epidemiologie von Pilzinfektionen 1

1.2. Diagnose von Pilzinfektionen 5

1.2.1. Blutkulturen (BacT/Alert) 7

1.2.2. Serologische Nachweismethoden 8

1.2.2.1. Der Sandwich-ELISA zur Detektion von Aspergillus-Galactomannan 8

1.2.2.2. Der Latex-Agglutinationstest 8

1.2.2.3. Der Nachweis von (1-3)-ß-D-Glucan 8

1.2.3. Molekularbiologische Nachweismethoden: Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 9

1.2.4. NASBA 10

1.3. Therapie und Prophylaxe systemischer Pilzinfektionen 10

1.3.1. Amphotericin B: konventionelle Zubereitung mit Desoxycholat 11

1.3.2. Amphotericin B: liposomale Zubereitung 12

1.3.3. Itraconazol 14

1.3.4. Fluconazol 15

1.3.5. Neue Triazolderivate (Voriconazol, Posaconazol, Ravuconazol) 16

1.4. Chirurgische Behandlung invasiver Pilzinfektionen 18

1.5. Prophylaxe von Pilzinfektionen 18

1.6. Ziel der Arbeit 20

2. Material und Methoden **21**

2.1. Material 21

2.1.1. Geräte 21

2.1.2. Kits, Primer, Gensonde und Verbrauchsmaterialien 21

2.1.3. Chemikalien und andere Gebrauchsstoffe 22

2.1.4. Verwendete Pilzstämme und deren Herkunftsbezeichnung 22

2.1.5. Primer und Gensonden 23

2.2. Methoden 23

2.2.1. Extraktion der RNA 23

2.2.2. Zelllyse 23

2.2.3. Isolierung und Reinigung der RNA 24

2.2.4. Eluierung der RNA 24

2.2.5. Alternative Möglichkeit der RNA-Extraktion 24
2.2.6. Amplifikation der RNA 25
2.2.7. Detektion der amplifizierten RNA 27
2.2.8. Durchführung der PCR 27
2.2.9. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit RNA/DNA 28
2.3. Charakterisierung des Patientengutes 29
2.3.1. Stellenwert im Gesamtverlauf der Arbeit 29
2.3.2. Klinische Daten/Befunde/Verläufe 30
3. Ergebnisse **32**
3.1. Kontrolle der Methodik 32
3.1.1. Sensitivitätskontrolle 32
3.1.2. Spezifitätskontrolle 33
3.1.3. Posititiv-/Negativkontrollen 35
3.1.4. Kein Nachweis von genomischer Aspergillus-DNA mittels NASBA 36
3.2. Verwendung von Blut als Probenmaterial 36
3.2.1. Beständigkeit von RNA in Blut 36
3.2.2. Einfluß von Koinfektionen auf die Sensitivität/Spezifität der NASBA Methode 37
3.3 Ergebnisse von NASBA bzw. der LC-PCR bezüglich Patientenproben 38
3.3.1. Patient 1 38
3.3.2. Patienten 2 39
3.3.3. Patient 3 40
3.3.4. Patient 4 41
4. Diskussion **42**
4.1. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit 43
4.1.1. Ergebnisse von NASBA bez. Detektion von Aspergillus-RNA 43
4.1.2. Ergebnisse von NASBA bez. Patientenproben 44
4.2. Vergleich mit anderen modernen Nachweismethoden für Aspergillus Spezies 45
4.2.1. Blutkulturen 45
4.2.2. Serologische Nachweismethoden 46
4.2.2.1. Der Sandwich-ELISA zur Detektion von Aspergillus-Galactomannan 46
4.2.2.2. Der Latex-Agglutinationstest 47
4.2.2.3. Der Nachweis von (1-3)-ß-D-Glucan 48

4.2.3. Molekularbiologische Nachweismethoden: PCR 49
4.3. Charakteristika von NASBA 51
4.3.1. Einsatzmöglichkeiten bei anderen Pilz Spezies 52
4.3.2. Einsatzmöglichkeiten bei Viren 53
4.3.3. Einsatzmöglichkeiten bei Bakterien 55
4.4. Kontaminationen 56
4.5. NASBA als Bestandteil neuer Behandlungsstrategien systemischer Aspergillosen 56
5. Zusammenfassung 58
6. Literaturverzeichnis 60

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie von Pilzinfektionen

Invasive Pilzinfektionen nehmen in alarmierendem Umfang zu und besitzen daher in vielen Bereichen der Medizin eine nicht zu unterschätzende Bedeutung. Dieser Anstieg ist direkt auf eine steigende Anzahl von Patienten mit Immunsuppression zurückzuführen. In diesem Zusammenhang sind Änderungen bei Behandlungsstrategien wie der vermehrte Einsatz intensiver Chemotherapien und immunsupprimierender Medikamente zu nennen. Ebenso haben Krankheiten, die eine Immunsuppression bedingen, erheblich zu diesem Problem beigetragen, man denke hierbei in erster Linie an AIDS (21).

Im Rahmen der Pilzinfektionen unterscheidet man zwischen oberflächlichen bzw. subkutanen und systemischen Pilzinfektionen. Oberflächliche bzw. subkutane Pilzinfektionen betreffen Millionen Menschen weltweit, sind jedoch nur in den seltensten Fällen lebensbedrohlich und können meist einfach diagnostiziert und behandelt werden. Gänzlich anders verhält es sich mit den systemischen Pilzinfektionen. Sie können lebensbedrohlich sein, zeichnen sich durch eine hohe Morbidität und Mortalität aus und werden zum überwiegenden Teil durch opportunistische Erreger hervorgerufen. Dabei sind an erster Stelle Candida albicans und Aspergillus Spezies zu nennen, aber auch andere Pilze wie non-albicans Candida Spezies spielen eine immer größere Rolle.

Wertet man hierzu Studien aus, die an US-amerikanischen Krankenhäusern durchgeführt wurden, so zeigt sich die Zunahme der Pilzinfektionen allgemein besonders deutlich (21). Zwischen 1980 und 1990 stieg die Zahl der in Krankenhäusern erworbenen Pilzinfektionen von 2,0 auf 3,8 Infektionen pro 1000 Patienten (21). Eine kleinere Studie an einem taiwanesischen Krankenhaus verzeichnete einen Anstieg von 0,9 auf 6,6 Infektionen pro 1000 Patienten in den Jahren 1981 bis 1993 (21).

Nun sind in diesem Zusammenhang Patientengruppen mit erhöhtem Risiko für Pilzinfektionen genauer zu betrachten. Patienten mit hämatologischen Erkrankungen gehören zu oben genannten Patientengruppen, da es hier oftmals zu einer längeren Phase der Neutropenie kommt, entweder durch die Krankheit selbst oder durch die Behandlung verursacht. So wurde bei 20 bis 50 % der Patienten, die an einer hämatologischen Erkrankung verstorben waren, eine invasive Pilzinfektionen nachgewiesen (21). Eine retrospektive Studie beschreibt die Mortalität bestimmter Pilzinfektionen bei Patienten nach Knochenmarktransplantation und findet einen Wert von 73 % für Infektionen mit

Candida Spezies und 84 % für Infektionen mit Aspergillus Spezies. Diese Werte waren sogar noch höher bei Patienten, die Infektionen sowohl mit Candida Spezies als auch mit Aspergillus Spezies aufwiesen (21).

Des weiteren sind Patienten nach Organtransplantation vermehrt empfindlich gegenüber systemischen Pilzinfektionen, da sie immunsupprimierende Medikamente zur Verringerung des Abstoßungsrisikos erhalten. Solche Infektionen treten bei 5 bis 45 % aller Patienten nach Organtransplantation auf und sind ein Hauptgrund für Morbidität und Mortalität bei dieser Patientengruppe (21).

Auch Patienten mit Verbrennungen haben ein erhöhtes Risiko für eine generalisierte Pilzinfektionen; der verbrannte Hautbereich wird häufig von opportunistischen Pilzen, vor allem Candida Spezies, besiedelt. Da in diesen Fällen meist zusätzlich eine Immunsuppression vorliegt, ist der Übergang in eine systemische Erkrankung möglich (21).

Eine andere große Patientengruppe sind Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation (KMT). Meist liegt in diesem Zusammenhang entweder eine Leukämie, ein Non-Hodgkin-Lymphom, ein M. Hodgkin, ein myelodysplastisches Syndrom oder ein Plasmozytom als Grunderkrankung vor. Hier besteht zusätzlich in 15-25% der Fälle das Risiko einer akuten Graft-versus-Host Disease (GvHD), in 30 % der Fälle das Risiko einer chronischen GvHD. Das natürliche Abwehrsystem kann auf diesem Wege stark geschwächt werden, und eine Erhöhung der immunsuppressiven Therapie wird normalerweise notwendig. In einer Studie betrug die Inzidenz invasiver Aspergillosen bei Patienten nach allogener KMT 5 bis 15 % (6, 15, 31, 51, 64, 78). Insbesondere wurde bei diesen Patienten eine außerordentlich hohe Mortalität der invasiven Aspergillosen gefunden, sie lag bei 80 bis 90 % (14).

Unbedingt zu erwähnen sind Patienten mit erworbener Immunschwächekrankheit (AIDS). Aufgrund des hohen Grades an Immunsuppression bei dieser Patientengruppe können Pilzinfektionen hier ungewöhnlich virulent ausfallen und über einen längeren Zeitraum persistieren. Zwischen 60 und 90 % der Patienten mit fortgeschrittener AIDS-Erkrankung entwickeln zumindest eine Pilzinfektion im Verlauf der Erkrankung (21). Am häufigsten sind dabei Infektionen mit Candida Spezies, Cryptococcus Spezies und, etwas weniger häufig, Aspergillus Spezies (21). In einigen geographischen Regionen sind noch andere Pilz Spezies wichtig, z.B. Penicillium Spezies und Histoplasma Spezies (21).

Weiterhin muß auf Patienten mit zystischer Fibrose eingegangen werden. Bei dieser erblichen Stoffwechselstörung besteht eine vermehrte Produktion und erhöhte Viskosität

vor allem des Bronchialsekrets. Hierdurch kommt es zu schwerwiegenden Komplikationen im Bereich der Atemwege, das zähe Sekret verbleibt zu einem großen Teil im Bronchialsystem und bildet einen idealen Nährboden für verschiedene Pilz Spezies. In den Jahren 1982 bis 1987 wurde im Rahmen einer Studie an 62 Patienten mit zystischer Fibrose eine Autopsie durchgeführt. Als Ergebnis wurde bei 21 % dieser Patienten eine Besiedlung mit Pilz Spezies gefunden, entweder war der Respirationstrakt betroffen oder es handelte sich um eine anderweitig lokalisierte Infektion. Nur drei Patienten wiesen eine systemische Pilzinfektion auf. Die Spezies konnten als Aspergillus Spezies, Candida Spezies und Histoplasma capsulatum identifiziert werden (21).

Patienten mit septischer Granulomatose, einer angeborenen Abnormalität der neutrophilen Granulozyten, sind ebenfalls prädisponiert für systemische Pilzinfektionen, da diese Granulozyten bei der Abwehr von Pilzen eine wichtige Rolle spielen. Im Rahmen einer Untersuchung bei 245 Patienten mit septischer Granulomatose konnten bei 20 % der Fälle Pilze, einschließlich Candida und Aspergillus Spezies, nachgewiesen werden (21).

In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß eine geschädigte Schleimhautbarriere, sei es durch bakterielle oder virale Infektionen, generell das Risiko für Infektionen mit Candida Spezies erhöht. Außerdem erlaubt der Einsatz bestimmter Antibiotika, die eine Störung der natürlichen Bakterienflora verursachen, eine Besiedlung durch Pilze. Ebenso sind Patienten mit einem hohen Grad an Besiedlung des Gastrointestinaltraktes bzw. der Mundhöhle durch Candida Spezies besonders empfindlich gegenüber generalisierten Pilzinfektionen (21).

Immunsupprimierte Patienten können sich in ihrer Umgebung, z.B. Krankenzimmer, Operationssaal, schnell infizieren, wenn allgemeine Sicherheitsvorkehrungen im Hinblick auf Pilzinfektionen nicht beachtet werden. Zum einen ist die Übertragung von Candida Spezies durch die Hände von medizinischem Personal eine wichtiger Grund für nosokomiale Infektionen. Händewaschen bzw. –desinfektion sind daher von vitaler Bedeutung (21). Zum anderen ist Aspergillus eine Pilz Spezies, welche über die Luft verbreitet werden kann; daher ist der Gebrauch von speziellen Filteranlagen in Ventilationssystemen absolut erforderlich (21).

Die Inzidenz systemischer Pilzinfektionen sollte nach Möglichkeit genau protokolliert und überwacht werden, um auf epidemiologische Veränderungen und Trends frühzeitig aufmerksam zu werden. Die meisten im Krankenhaus erworbenen Pilzinfektionen werden durch Candida Spezies verursacht (21); Infektionen durch Aspergillus Spezies nehmen

jedoch der Häufigkeit nach zu (21). Im folgenden soll nun auf einzelne Pilz Spezies genauer eingegangen werden.

Candida

In einer internationalen Studie an Krebspatienten waren Candida Spezies für 58 % aller Pilzinfektionen verantwortlich (21). Unter den häufigsten Ursachen für systemische Pilzinfektionen finden sich Candida Spezies an vierter Stelle (21). Nosokomiale Candidiasis kann entweder endogen (durch bestehende Besiedlung der Mundhöhle, des Gastrointestinaltraktes, der Vagina oder der Haut) oder, seltener, exogen (Ansteckung von anderen Patienten oder medizinischem Personal) erworben sein.

Candida albicans wird am häufigsten nachgewiesen, verursacht diese Spezies doch zwischen 48 und 60 % aller systemischen Pilzinfektionen (21). Allerdings spielen seit wenigen Jahren einige non-albicans Candida Spezies wie Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida tropicalis und Candida glabrata eine immer größere Rolle (21). Bei einer über 3,5 Jahre angelegten Untersuchung an vier Krankenhäusern stieg der Anteil der non-albicans Candidiasis-Fälle an allen Candidiasis-Fällen von 40 auf 53 % während der Untersuchungszeit (21).

Aspergillus

Aspergillus Spezies sind ubiquitär vorhanden und meist im Erdreich, Wasser und in verwesenden Pflanzenteilen zu finden. Eine Infektion mit Aspergillus ereignet sich zum allergrößten Teil über den Respirationstrakt und in enger Beziehung zu Baumaßnahmen im Krankenhaus oder kontaminierten Ventilationssystemen (21). Die Zahl der Aspergillus-Infektionen ist in den letzten Jahren signifikant angestiegen, was mittels einer Studie an Krebspatienten belegt werden konnte. Hier wurden Aspergillus Spezies bei 30 % aller Pilzinfektionen entdeckt (21). Die Inzidenz von Aspergillus-Infektionen bei neutropenischen Patienten variiert von Krankenhaus zu Krankenhaus. Eine europäische Studie an Patienten mit Plasmozytom kam zu dem Ergebnis, daß 45 % aller Patienten mit Aspergillose an dieser Infektion verstorben waren (21). In einer anderen Studie konnten Aspergillus Spezies bei 36 % von Patienten mit Lungenentzündung, die in einer Knochenmarktransplantations-Einheit lagen, nachgewiesen werden (21).

Eine invasive Aspergillose wird im Regelfall durch Aspergillus fumigatus und, zu einem geringeren Ausmaß, von Aspergillus niger, Aspergillus flavus und Aspergillus terreus verursacht.

Cryptococcus

Normalerweise findet eine Cryptococcus-Infektion durch die Inhalation von Cryptococcus neoformans statt; diese Spezies kommt hauptsächlich in von Tauben- oder Hühnerexkrementen kontaminiertem Erdreich vor. Cryptococcus besitzt eine außergewöhnliche Affinität zum zentralen Nervensystem und ist in diesem Zusammenhang der Auslöser der sogenannten Cryptococcus-Meningitis. Zudem ist die Infektion durch Cryptococcus bei HIV-Patienten die Pilzinfektion mit der höchsten Mortalität (21).

Seltene opportunistische Pilz Spezies

Hierbei handelt es sich um einige Spezies, die in den letzten Jahren in Erscheinung getreten sind, wie z.B. Penicillium marneffei, Fusarium Spezies, Malassezia Spezies, Trichosporon Spezies, Saccharomyces cerevisiae und Blastoschizomyces capitatus (21). Als Beispiel sei Südostasien genannt, wo die Infektion mit Penicillium Spezies derzeit die drittgrößte Häufigkeit unter den opportunistischen Infektionen bei HIV-Patienten aufweist. Einige wenige Fälle sind darüber hinaus in westlichen Ländern bekannt geworden (21).

Pilzinfektionen, welche durch Spezies der Gattung Mucorales hervorgerufen wurden, finden sich in zunehmendem Maße bei immunsupprimierten Patienten und können mit dem Vorhandensein eines Diabetes in Verbindung gebracht werden. Zu dieser Gattung gehören z.B. Mucor, Absidia und Rhizopus (21). Mucorales-Infektionen sind zumeist in den oberen und unteren Luftwegen lokalisiert und zeigen klinische Symptome ähnlich denen einer Aspergillose.

1.2 Diagnose von Pilzinfektionen

Die Diagnose einer systemischen Pilzinfektion ist grundsätzlich schwierig zu stellen, und viele Infektionen werden erst gesichert, wenn der Patient bereits verstorben ist (21).

Zunächst einmal existiert die Tatsache, daß klinische Symptome wie antibiotikaresistentes Fieber, trockener Husten oder Abgeschlagenheit unspezifisch sind und denen einer bakteriellen oder viralen Infektion ähneln können. Auch treten diese Symptome in der Frühphase der Infektion oft nicht auf.

Weiterhin ist der Nachweis des Erregers aus klinischen Proben unzuverlässig, und das Nachweisverfahren mit vielerlei Problemen behaftet, wie z.B. die Kontamination der Probe durch ubiquitär vorhandene Pilz Spezies, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann (21). In diesem Zusammenhang ist es auch wichtig zu erwähnen, daß zur Gewinnung von Probenmaterial häufig ein invasiver Eingriff in Form einer Biopsie oder ähnlichem notwendig wird. Ein solcher Eingriff ist bei Patienten in kritischem Zustand, z.B. Knochenmarktransplantierte in Neutro- oder Thrombopenie, nur unter erhöhtem Risiko oder gar nicht durchführbar. Zusätzlich ist die Diagnose einer invasiven Pilzinfektion gerade bei neutropenen Patienten oft schwierig zu sichern, da sogar bei disseminierter Erkrankung die Erregerzahl im Blut meist niedrig ist. Der Nachweis von Pilzen aus Blutkulturen ist gewöhnlich mit einer sehr niedrigen Sensitivität und Spezifität behaftet, serologische Tests, welche Antikörper gegen Pilzantigene nachweisen, besitzen den gleichen Nachteil. Dies ist hier zu einem gewissen Teil durch die Immunsuppression und die dadurch abgeschwächte Immunantwort der Patienten bedingt. Außerdem wird der praktische Nutzen solcher serologischer Tests durch die relativ lange Zeitspanne zwischen dem Eindringen der Erreger in die Blutbahn und der Bildung von Antikörpern deutlich eingeschränkt. Diese Zeitspanne kann bis zu mehreren Tagen betragen und tritt im übrigen auch bei immunkompetenten Menschen auf.

Hierbei haben jedoch Studien gezeigt, daß die Prognose des Patienten durch eine frühzeitige Diagnosestellung im Verlauf einer systemischen Pilzinfektion und, daraus folgend, eine frühe, zielgerichtete antimykotische Therapie verbessert wird (2, 10, 77). Als Beispiel seien Fortschritte bei der Diagnose der invasiven Aspergillose der Lunge genannt. Diese schließen den vermehrten routinemäßigen Gebrauch von hochauflösender Computertomographie (CT) (21), der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von DNA und RNA und dem ELISA zum Nachweis von zirkulierendem Aspergillus-Galactomannan, einem Bestandteil der Pilzzellwand, ein (21). Keine dieser Nachweismethoden kann eine systemische Erkrankung wirklich beweisen, aber ein positives Ergebnis hat einen hohen prädiktiven Wert in Bezug auf das Vorliegen einer solchen.

Mehrere positive Ergebnisse aus verschiedenen diagnostischen Tests sind daher am besten geeignet, eine systemische Pilzinfektion vorherzusagen oder anzuzeigen; meist bleibt aufgrund des lebensbedrohlichen Zustandes des Patienten nicht genügend Zeit für eine umfassende Diagnostik.

Es wird folglich eine geeignete Screeningmethode, vor allem für Patienten mit einem Risiko für die Entwicklung einer invasiven Pilzinfektion, benötigt. Zu fordern sind ein hohes Maß an Sensitivität, um einen hohen negativen Vorhersagewert zu erhalten. Zudem sollte für einen befriedigenden positiven Vorhersagewert die Spezifität der Methode ausreichend hoch sein. Nicht minder wichtig wäre, wie bereits erwähnt, eine möglichst kurze Zeitspanne zwischen Probenentnahme und Testergebnis.

Bleiben wir bei dem Beispiel der invasiven Aspergillose. Diese besitzt, wie bereits beschrieben, eine äußerst hohe Mortalität. Aus diesem Grund kann hier ein gewisses Maß an Übertherapie und weiterführender Diagnostik in Kauf genommen werden. Hinzu kommt, daß heutzutage die gängige Praxis der empirischen antimykotischen Behandlung größtenteils auf Infiltraten im Röntgenthoraxbild und dem Vorliegen antibiotikaresistenten Fiebers beruht. Dies zieht per se eine erhebliche Übertherapie nach sich. Weiterhin ist einfach zu gewinnendes Probenmaterial wünschenswert.

Außer der hier verwendeten Methode mittels NASBA-Technologie existieren einige weitere molekularbiologische Tests zum Nachweis von Aspergillus Spezies. Diese beruhen ebenfalls auf der Technik der Polymerase-Kettenreaktion. Dabei lassen sich zwei Gruppen voneinander abgrenzen: auf der einen Seite existieren PCR-Techniken, bei denen universelle Primer zur Amplifikation verwendet werden. So erhält man die Möglichkeit, eine große Anzahl verschiedener Pilz Spezies zu amplifizieren. Erst beim Nachweis der Amplifikate wird dann eine Differenzierung durchgeführt (26, 29, 34, 63, 74, 79). Die NASBA-Technologie läßt sich auch dieser Gruppe zuordnen, der spezifische Nachweis von Aspergillus fumigatus-RNA erfolgt hierbei durch eine spezifische Oligonukleotidsonde.

Andererseits gibt es PCR-Techniken, die mittels spezifischen Primern exklusiv Aspergillus Spezies amplifizieren (8, 20, 32, 50, 67, 72, 84).

Im folgenden soll nun auf die wichtigsten Nachweismethoden für Pilzinfektionen näher eingegangen werden.

1.2.1 Blutkulturen (BacT/Alert)

BacT/Alert (Organon Teknika Corp., Durham, N.C., USA) ist ein automatisiertes System zum Nachweis verschiedener Pathogene (hauptsächlich Bakterien und Pilze) aus Blutkulturen. Es kommt derzeit im Vergleich zu anderen Systemen am häufigsten zum Einsatz. Das BacT/Alert-System basiert auf der Detektion von Kohlendioxid durch einen

Farbsensor, welcher auf dem Boden von Blutkulturflaschen angebracht ist. Die Kohlendioxidkonzentration in der Flasche wird in einem zehnminütigen Rhythmus gemessen und mit der anfänglichen Konzentration verglichen. BacT/Alert kann sowohl bei aeroben als auch bei anaeroben Blutkulturflaschen angewandt werden und benötigt fünf bis zehn ml Blut pro Flasche (60).

1.2.2 Serologische Nachweismethoden

1.2.2.1. Der Sandwich-ELISA zur Detektion von Aspergillus-Galactomannan

Der Sandwich-ELISA weist Aspergillus-Galactomannan in Körperflüssigkeiten mittels des monoklonalen IgM-Antikörpers EB-A2 aus der Ratte nach und ist derzeit kommerziell erhältlich (Platelia Aspergillus; Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, Frankreich). Galactomannan ist ein Polysaccharid und eine der Hauptkomponenten der Zellwand von Aspergillus Spezies (76).

1.2.2.2 Der Latex-Agglutinationstest

Diese Untersuchungsmethode ist kommerziell erhältlich (Pastorex Aspergillus, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, Frankreich) und arbeitet mit demselben Antikörper wie der unter 1.2.2.1. beschriebene Sandwich-ELISA. Mittels diesem Test kann Galactomannan in Körperflüssigkeiten zur Diagnose einer invasiven Aspergillose nachgewiesen werden (25).

1.2.2.3 Der Nachweis von (1-3)-β-D-Glucan

Man ist heute in der Lage, (1-3)-β-D-Glucan, ein Zellwandbestandteil von Pilzen, im Plasma von Patienten mit invasiven Pilzinfektionen nachzuweisen. Dies geschieht mit Hilfe eines Koagulationsenzyms des Pfeilschwanzkrebses (Limulus), dem Faktor G, welcher hoch sensitiv für (1-3)-β-D-Glucan ist. Der Test ist derzeit in automatisierter Form erhältlich und besitzt als Grenzwert zur Bestimmung, ob eine Probe als positiv oder negativ zu betrachten ist, den Wert 20 pg (1-3)-β-D-Glucan/ml Plasma (55).

1.2.3 Molekularbiologische Nachweismethoden: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist die am besten bekannte und am weitesten verbreitete molekularbiologische Nachweismethode für verschiedenste Mikroorganismen, sie kommt vor allem im Bereich der Pilzdiagnostik häufig zum Einsatz. Eine PCR funktioniert nach folgendem Prinzip: zunächst wird doppelsträngige DNA thermisch gespalten, so daß einzelsträngige DNA vorliegt. Daraufhin erfolgt mittels DNA-Polymerasen die Neusynthese von bestimmten DNA-Abschnitten, die von synthetischen Oligonukleotiden (sogenannten Primern) eingerahmt sind. Durch die Wahl der Primer können die zu synthetisierenden DNA-Abschnitte festgelegt werden. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Vorgangs (20-40 Zyklen) können, ausgehend von geringen Mengen an DNA (10^{-9}-10^{-15} g), mittels exponentieller Anreicherung (über eine Million Kopien) die DNA-Abschnitte nachweisbar gemacht werden; hierzu wird die Technik der Elektrophorese angewandt. Der Zeitaufwand beträgt dabei drei bis vier Stunden. Außerdem müssen die Proben während der Durchführung einer PCR großen und abrupten Temperaturwechseln ausgesetzt werden, wofür spezialisierte Gerätschaften benötigt werden.
Zum Nachweis von RNA-Abschnitten muß die RNA zuerst mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in DNA umkopiert werden; der weitere Verlauf gestaltet sich wie oben beschrieben (11).
Die Polymerase-Kettenreaktion wird, wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, verbreitet zur Diagnostik von Pilzinfektionen eingesetzt; aus diesem Grunde soll dieser Bereich hier näher erläutert werden.

PCR-Methoden mit universellen pilzspezifischen Primern
Diese PCR-Methoden können viele verschiedene Pilz Spezies nachweisen. Um eine ausreichend hohe Sensitivität zu gewährleisten, wählt man im Pilzgenom hochkonservierte Regionen bestimmter ribosomaler Multi-Copy-Gene als Zielsequenz. Damit wird die Sensitivität der Methode deutlich erhöht gegenüber der Amplifikation eines Gens, das nur in wenigen Kopien vorkommt. Häufig beschriebene Target-Regionen sind das 18S rRNA-Gen (29, 34, 74, 79) und das 28S rRNA-Gen (26, 63). Ein Abschnitt aus dem 18S rRNA-Gen ist auch Target der NASBA-Technologie. 100 bis 300 Kopien dieses Gens kommen in Pilzzellen vor.

PCR-Methoden mit Aspergillus-spezifischen Primern

Hierbei existieren zwei Varianten von PCR-Methoden: ein Teil amplifiziert mittels spezifischen Primern ausschließlich Aspergillus fumigatus (20, 67), der andere kann gleichzeitig die DNA von mehreren Aspergillus Spezies, wie z.B. Aspergillus flavus oder Aspergillus niger amplifizieren (8, 32, 50, 72, 84).

Das 18S rRNA-Gen (20, 50, 84), ein Fragment aus dem Bereich der 26S/intergen Spacer Region des rDNA-Komplexes (67), sowie Gene, die für alkalische Proteasen kodieren (72) als auch mitochondriale Gene (8, 32) dienen in diesem Zusammenhang als Zielsequenz.

Als klinisches Probenmaterial kommen hauptsächlich Proben aus einer BAL (bronchoalveolären Lavage) (8, 20, 32, 50, 67, 72), jedoch auch Sputum, also Material aus dem Respirationstrakt zum Einsatz (67). Weiterhin werden bei einer PCR-Methode in diesem Zusammenhang Serumproben verwendet (84, 85).

1.2.4 NASBA

NASBA ist eine Technologie zur isothermalen, d.h. auf nur einer Temperaturstufe ablaufenden Amplifikation von RNA-Sequenzen mittels einer bestimmten RNA Polymerase (44, 46). In einem weiteren Schritt erfolgt daraufhin die Detektion der amplifizierten RNA-Sequenzen sowie die Ausgabe der Ergebnisse in einem einfachen und übersichtlichen Format. Die NASBA-Technologie ist nun darüber hinaus durch eine aktuelle Weiterentwicklung (NucliSens EasyQ, BioMerieux) in der Lage, die Amplifikations- und Detektionsschritte gleichzeitig auszuführen.

1.3 Therapie und Prophylaxe systemischer Pilzinfektionen

Heutzutage wird neben einer steigenden Anzahl an systemischen Pilzinfektionen eine immer größer werdende Vielfalt an infektionsauslösenden Pilz Spezies beobachtet. Zusätzlich treten Resistenzen gegenüber verschiedenen auf dem Markt erhältlichen Antimykotika auf; dies trifft vor allem auf Hefen, aber auch auf einige Schimmelpilze wie Fusarium, Scedosporium und manche Aspergillus Spezies zu (18). Infektionen werden außerdem immer wieder durch seltene Pilz Spezies verursacht, für welche die Empfindlichkeit in Bezug auf antifungale Medikamente noch gar nicht untersucht wurde.

Bei immunsupprimierten Patienten kann eine Infektion selbst mit empfindlichen Pilzen zum Tode führen.

Im Hinblick auf diese schwierige Situation gibt es nur einige wenige antifungale Substanzen. Auch zeigen alle diese Substanzen Nachteile bezüglich ihrer Wirkungsspektren (18). Neben Amphotericin B, das in einer konventionellen Zubereitung und in verschiedenen liposomalen Zubereitungsformen vorliegt, existiert noch eine weitere Wirkstoffgruppe, die Triazole. Dabei handelt es sich um Substanzen, die sich zum Teil noch in der klinischen Erprobungsphase befinden und hierbei sehr vielversprechende Ergebnisse zeigen (z.B. Voriconazol, Posaconazol, Ravuconazol). Zwei andere Substanzen aus dieser Gruppe werden jedoch bereits im klinischen Alltag mit unterschiedlichem Erfolg eingesetzt; es handelt sich hier um Fluconazol und Itraconazol (18, 80).

1.3.1 Amphotericin B: konventionelle Zubereitung mit Desoxycholat

Amphotericin B wird seit 1957 eingesetzt (13) und besitzt unter den erhältlichen Antimykotika das breiteste Wirkungsspektrum. Daher stellt es für die meisten Formen der systemischen Pilzinfektion das Mittel der Wahl dar (18). Dies gilt in gleichem Maße für die empirische antimykotische Therapie bei neutropenen Patienten mit Fieber, das nicht auf eine Breitspektrumantibiose anspricht (81).

Problematisch im Rahmen einer Therapie sind die beschriebenen Nebenwirkungen des Amphotericin B. Hier muß vor allem auf die Nephrotoxizität hingewiesen werden; in diesem Zusammenhang führten Wingard et al. eine Studie an 239 immunsupprimierten Patienten mit fraglicher oder nachgewiesener Aspergillose durch. Die Rate der Nephrotoxizität (definiert als eine Verdoppelung des Kreatininwertes) lag bei 53 %. 14,5 % der Patienten mußte sich sogar einer Dialyse unterziehen (18).

Wird Patienten während einer Amphotericin B-Therapie gleichzeitig Cyclosporin A verabreicht, so erhöht sich diese Nephrotoxizität noch. Patienten nach Transplantationen sind im allgemeinen einem hohen Risiko ausgesetzt, eine invasive Pilzinfektion auszubilden. Sie müssen aber gleichzeitig oft zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen mit Cyclosporin A therapiert werden (40). Folglich muß die effektive Dosis von Amphotericin B häufig reduziert werden, um diese gravierende Nebenwirkung beherrschen zu können (18).

Weitere Schwierigkeiten bestehen in der Ansprechrate von Amphotericin B, welche nur etwa bei 55 % liegt (13). Für die Ansprechrate bei Leukämiepatienten mit invasiver Aspergillusinfektion beispielsweise wurde ein Wert von 54 % ermittelt, bei KMT-Patienten von 33 % (14). Bei KMT-Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillose beläuft sich die Mortalität therapieunabhängig auf über 94 %, dagegen wird bei Verwendung von Amphotericin B in Kombination mit Flucytosin, einem Pyrimidinderivat mit sowohl fungistatischen als auch fungiziden Eigenschaften, die Mortalitätsrate bei neutropenen Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillose gesenkt (13).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Einsatz von Amphotericin B in dieser Zubereitungsform sehr oft einen Kompromiß zwischen Wirksamkeit und Toxizität darstellt. Allgemein liegen keine genauen Richtlinien über die benötigte Dosis und die optimale Therapiedauer für Amphotericin B bei systemischen Pilzinfektionen vor (13). Als Beispiel sei die Empfehlung genannt, neutropene Patienten mit invasiver Aspergillose mit der maximal tolerierbaren Tagesdosis zu therapieren, diese liegt normalerweise bei 1-1,5 mg/kg (40).

1.3.2 Amphotericin B: liposomale Zubereitung

Im Laufe der Jahre hat es zahlreiche Versuche gegeben, das Problem der Nephrotoxizität von Amphotericin B besser in den Griff zu bekommen; diese führten unter anderem zu den kommerziell erhältlichen liposomalen Zubereitungsformen des Amphotericin B. Hierbei ist zunächst als wichtigster Vertreter dieser Gruppe das AmBisome zu erwähnen, welches das einzig echte Liposom darstellt. Neben AmBisome sind noch zwei weitere Lipidzubereitungen von Amphotericin B auf dem Markt. Zum einen wurde Amphotericin B zwischen scheibenartige Cholesterylsulfatpartikel eingebunden, diese Zubereitung ist als Amphocil bzw. Amphotec im Handel, zum anderen existiert noch das Abelcet. Dieses Medikament beinhaltet als wirksame Substanz einen bandförmigen Amphotericin B-Lipidkomplex (18, 22, 42).

Einige Studien stellen nun Vergleiche von AmBisome mit konventionellem Amphotericin B bezüglich Effektivität und Sicherheit an.

Prentice et al. führten eine randomisierte Studie an 134 Erwachsenen und 204 Kindern durch, in der sowohl liposomales als auch konventionelles Amphotericin B in der Behandlung von neutropenischem Fieber eingesetzt wurde. Bei AmBisome traten bei

Erwachsenen und Kindern signifikant weniger Nebenwirkungen verglichen mit konventionellem Amphotericin B auf. Des weiteren war bei AmBisome eine gleiche oder unter Umständen sogar höhere Effektivität zu beobachten (58).

Kelsey et al. testeten AmBisome in einer doppel-blinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie an 161 Patienten. Hier wurde AmBisome dreimal pro Woche als antimykotische Prophylaxe während der Neutropenie in einer Dosierung von 2 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Bei Patienten, die eine KMT oder eine intensive Chemotherapie erhielten, konnte die Pilzbesiedelung signifikant reduziert werden; darüberhinaus erwies sich AmBisome als sicher (37).

Weiterhin berichteten Walsh et al. über einen Vergleich von AmBisome mit konventionellem Amphotericin B als empirische antimykotische Therapie bei Patienten mit persistierendem Fieber und Neutropenie. Dieser wurde mittels einer doppel-blinden, randomisierten, multizentrischen Studie an 687 Patienten durchgeführt. Hier erwies sich AmBisome als ebenso effektiv wie konventionelles Amphotericin B. Zusätzlich wurden in der Gruppe der mit AmBisome behandelten Patienten weniger Durchbruchsinfektionen unter der empirischen Behandlung festgestellt. Außerdem zeigten sich unter AmBisome sowohl eine deutlich geringere infusionsbezogene Toxizität als auch Nephrotoxizität (18, 80).

Groll et al. untersuchten den Gehalt an Amphotericin B in Gehirngewebe von Kaninchen nach Gabe von verschiedenen Zubereitungsformen dieses Wirkstoffes. Die Behandlung mit AmBisome führte, verglichen mit den anderen Medikamenten, zu einer sechsmal höheren Konzentration von Amphotericin B im entsprechenden Gehirngewebe. Die klinische Relevanz dieses Resultates ist allerdings noch nicht vollständig geklärt (18, 24).

Für die Ansprechraten bei der Therapie nachgewiesener Aspergillusinfektionen durch AmBisome wurden in zwei nicht-randomisierten Untersuchungen Werte von 61 % bzw. 62 % ermittelt (52, 59).

Zusammenfassend konnte für AmBisome in mehreren Studien eine vergleichbare oder wahrscheinlich sogar höhere Effektivität gegenüber konventionellem Amphotericin B festgestellt werden. Darüberhinaus fiel in allen Studien eine deutlich geringere Rate an Nebenwirkungen und vor allem eine geringere Nephrotoxizität auf.

Indikationen für den Einsatz der liposomalen Zubereitungsformen von Amphotericin B ergeben sich somit zum einen klassischerweise für Patienten, die auf eine Therapie mit konventionellem Amphotericin B nicht ansprechen oder bei denen Unverträglichkeitsreaktionen auf konventionelles Amphotericin B auftreten. Zum anderen

sollten Patienten mit Niereninsuffizienz oder solche, die schon nephrotoxische Medikamente bekommen, diese Zubereitungsform als Mittel der ersten Wahl erhalten. Trotz allem sind Vor- und Nachteile einer solchen Behandlung gegeneinander abzuwägen, da durch den hohen Preis vor allem von AmBisome einige Vorzüge dieser Zubereitungsform relativiert werden; auch müssen Kosten, die durch eine eventuelle Nierenschädigung entstehen, mitberücksichtigt werden. In diesem Zusammenhang sollten noch weitere Kosten-Effektivitätsstudien angefertigt werden (18).

1.3.3 Itraconazol

Itraconazol liegt zur oralen und intravenösen Applikation vor, wobei die Erfahrung bezüglich der intravenösen Applikationsform bisher noch nicht sehr groß ist. In den meisten Fällen wird Itraconazol oral verabreicht; diese Tatsache macht den Einsatz bei Patienten mit geschädigten Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes oder mit Schluckschwierigkeiten problematisch. Außerdem besitzt Itraconazol in der oralen Applikationsform per se eine unerwünschte Nebenwirkung in Form von gastrointestinalen Störungen und eine von Patient zu Patient unterschiedliche Bioverfügbarkeit. Nun werden durch Konditionierungsbehandlungen vor einer KMT oder durch zytostatische Chemotherapien die Schleimhäute stark in Mitleidenschaft gezogen, was die Gabe von Itraconazol gerade bei Patienten mit einem hohen Risiko für die Entwicklung einer systemischen Pilzinfektion massiv erschwert (40, 80).
Hinzu kommt, daß bei verschiedenen Patienten die Serumspiegel permanent kontrolliert werden müssen, da die Absorption jeweils unterschiedlich ist (13, 40).
Weiterhin zu erwähnen ist das Auftreten einer Wechselwirkung bei gleichzeitiger Applikation von Cyclosporin A: es wird ein Ansteigen der Serumspiegel von Cyclosporin A beobachtet; aus diesem Grund sollten bei gemeinsamer Verabreichung beider Substanzen die jeweiligen Serumspiegel überwacht werden (81). Zu beachten ist diese Wechselwirkung auch bei Itraconazol in Kombination mit Stoffen, die den P-450-Metabolismus stimulieren (z.B. Phenytoin, Carbamazepin, Rifampicin, Phenobarbital) (40). Auch werden schon Itraconazol-resistente Aspergillus fumigatus-Stämme beschrieben (40).
Boogaerts et al. untersuchten die Wirksamkeit und die Häufigkeit von Nebenwirkungen bei Itraconazol verglichen mit Amphotericin B als empirische antimykotische Therapien, wobei sowohl die intravenöse als auch die orale Applikationsform des Itraconazols zum

Einsatz kam. Hierzu wurde an 384 neutropenischen Krebspatienten mit antibiotikaresistentem persistierendem Fieber eine randomisierte Studie durchgeführt. Es zeigte sich, daß Itraconazol und Amphotericin B als empirische antimykotische Therapien eine vergleichbare Wirksamkeit besitzen. Allerdings wurden bei Itraconazol signifikant weniger Nebenwirkungen und eine geringere Toxizität festgestellt (7).
Des weiteren wird von einigen Patienten mit invasiver Aspergillusinfektion berichtet, bei denen Itraconazol im Gegensatz zu Amphotericin B gewirkt hatte (81). So ist Itraconazol zur Zeit am ehesten für zwei Gruppen von Patienten geeignet: solche, mit einer leichteren Immunsuppression, also mit der Möglichkeit zur Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt oder solche, bei denen mittels Amphotericin B keine Wirkung erzielt werden konnte oder dieses wegen toxischer Erscheinungen abgesetzt werden mußte (40). Des weiteren kann Itraconazol im Bereich der Sekundärprophylaxe zum Einsatz kommen (17). Die allgemeine Ansprechrate für Itraconazol ist mit ungefähr 34 % eher niedrig (15), und die Therapie sollte in jedem Fall über mehrere Monate hinweg durchgeführt werden (40). D.W. Denning et al. fanden eine Wirksamkeit bei pulmonaler, Perikard- und Skelettinfektion (13). Trotzdem wird Itraconazol derzeit eher als Mittel der zweiten Wahl zur Therapie einer systemischen Pilzinfektion betrachtet, vor allem auch wegen seiner stark schwankenden Bioverfügbarkeit (40, 80).

1.3.4 Fluconazol

Fluconazol gehört wie Itraconazol zur Gruppe der Triazole und hemmt somit die Ergosterinsynthese von Pilzen. Der Einsatz von Fluconazol im klinischen Alltag wird allerdings durch das schmale Wirkungsspektrum dieser Substanz limitiert und beschränkt sich auf Hefepilze.
Auch im Zusammenhang mit Fluconazol wurden Untersuchungen mit der Fragestellung angefertigt, ob sich dieses Medikament zur empirischen antimykotischen Therapie eignet. So zeigten Malik et al. in einer randomisierten Studie an 106 neutropenischen Patienten mit antibiotikaresistentem Fieber unklarer Ursache eine vergleichbare Wirksamkeit von Fluconazol und Amphotericin B. Schwere Nebenwirkungen wie Hypokaliämie, Bronchospasmus und Nephrotoxizität traten bei der mit Fluconazol behandelten Patientengruppe deutlich seltener auf (48).
In einer ähnlich aufgebauten Studie von Winston et al. wurden 317 Patienten mit Neutropenie und antibiotikaresistentem persistierendem Fieber zufällig in zwei Gruppen

eingeteilt und entweder mit Fluconazol oder mit Amphotericin B behandelt. Der Therapieerfolg war dadurch definiert, daß der jeweilige Patient nach Ablauf einer vorher festgelegten Zeitspanne fieberfrei war und keine klinischen Zeichen einer Pilzinfektion zeigte. Ein solcher Erfolg konnte bei 68 % der mit Fluconazol behandelten Patienten und bei 67 % der mit Amphotericin B behandelten Patienten attestiert werden. Unerwünschte Wirkungen wie Schüttelfrost, Elektrolytstörungen, Niereninsuffizienz und Atembeschwerden traten in der Fluconazol-Gruppe bei 13 % der Patienten auf und in der Amphotericin B-Gruppe bei 81 % der Patienten. Winston et al. folgerten daraus, daß Fluconazol als wirksame und sichere Alternative zu Amphotericin B bei vielen neutropenischen Patienten eingestzt werden kann. Es wird in dieser Arbeit nochmals auf die Tatsache hingewiesen, daß Fluconazol im Hinblick auf Aspergillus Spezies und andere Schimmelpilze wirkungslos sein kann und Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine solche Infektion entsprechend voruntersucht und therapiert werden sollten (83).

1.3.5 Neue Triazolderivate (Voriconazol, Posaconazol, Ravuconazol)

In den letzten Jahren wurde eine neue Generation von antimykotisch wirksamen Triazolen entwickelt; diese besitzt in vitro ein breites Wirkungsspektrum und in vivo eine hohe Wirkpotenz. Zusätzlich weisen diese Substanzen eine hervorragende Bioverfügbarkeit und zeigen im Hinblick auf die Nebenwirkungsrate deutliche Vorteile gegenüber Amphotericin B. Voriconazol, Posaconazol und Ravuconazol sind wichtige Vertreter dieser Gruppe und sollen kurz näher erläutert werden (80).

Voriconazol

Walsh et al. führten in den Jahren 1998 und 1999 eine prospektive randomisierte Studie zum Vergleich von Voriconazol mit liposomalem Amphotericin B durch. Hierzu wurden 849 neutropenische Patienten mit persistierendem Fieber und vergleichbar hohem Risiko für das Auftreten einer systemischen Pilzinfektion in zwei Gruppen eingeteilt und entweder mit Voriconazol oder mit liposomalem Amphotericin B behandelt. Als Ergebnis zeigte sich eine ähnliche Wirksamkeit beider Substanzen; die mit Voriconazol behandelte Patientengruppe war deutlich besser vor Durchbruchsinfektionen geschützt, was in einer anderen, kürzlich fertiggestellten Untersuchung von Patienten mit invasiver Aspergillose bestätigt wird. Die Nebenwirkungsrate und die Nephrotoxizität waren signifikant geringer.

Diese Studie kommt zu dem Schluß, daß Voriconazol als geeignetes Mittel für eine empirische antimykotische Therapie angesehen werden kann. Sein Einsatz ermöglicht es, sowohl die Häufigkeit von Durchbruchsinfektionen als auch von akuten Nebenwirkungen im Rahmen der Therapie zu senken und die Funktion der Nieren zu bewahren. Voriconazol kann als frühe antimykotische Therapie anstelle von Amphotericin B zur Anwendung kommen (80).

Posaconazol, Ravuconazol

Um die Wirksamkeit von Posaconazol und Ravuconazol in bezug auf verschiedene Candida Spezies näher zu untersuchen, fertigten Laverdiere et al. eine vergleichende Studie zwischen diesen beiden neuen Substanzen und einigen herkömmlichen antimykotisch wirksamen Medikamenten an, darunter Fluconazol, Itraconazol und Amphotericin B. Eingesetzt wurden 164 Proben von Krebspatienten mit Candidämie. Die Autoren legten besonderen Wert auf Candida Spezies, die in vitro Resistenzen gegenüber Fluconazol und Itraconazol zeigen. Zunächst wurden Candida Spezies betrachtet, die auf Fluconazol und Itraconazol empfindlich reagierten. Hier konnten für Ravuconazol eine 15fach höhere Wirksamkeit und für Posaconazol eine vierfach höhere Wirksamkeit im Vergleich mit Fluconazol nachgewiesen werden. Des weiteren war die Wirksamkeit der beiden neuen Substanzen dreimal höher als die von Itraconazol.

In die nun folgende Untersuchung wurden zusätzlich Proben mit Candida Spezies einbezogen, die Resistenzen gegenüber Fluconazol und/oder Itraconazol aufwiesen; dabei stellten die Autoren eine zwölf- bis 85fach höhere Wirksamkeit von Posaconazol und Ravuconazol verglichen mit Fluconazol und eine bis zu sechsmal höhere Wirksamkeit verglichen mit Itraconazol fest (41).

Diese Ergebnisse werden in einer anderen Studie von Pfaller et al. für Posaconazol bestätigt. Die Substanz zeigte beim Vergleich mit Fluconazol und Itraconazol eine größere Wirksamkeit im Hinblick auf alle getesteten Candida Spezies, insbesondere Candida albicans, und Cryptococcus neoformans (57).

Demnach sind Voriconazol, Posaconazol und Ravuconazol aufgrund ihrer breiten Wirkungsspektren und guten Wirksamkeiten bei vielen wichtigen pathogenen Pilz Spezies Substanzen mit vielversprechenden klinischen Einsatzmöglichkeiten.

1.4 Chirurgische Behandlung invasiver Pilzinfektionen

Bei einer chirurgischen Behandlung von beispielsweise invasiven pulmonalen Aspergillosen bei hämatologischen Patienten können gute Ergebnisse beobachtet werden, sie ist jedoch nur für einzelne Patienten anwendbar. Einige wenige Zentren operierten Patienten auch unter Neutropenie (3, 62).

Salerno et al. zeigten bei Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillusinfektion eine Heilungsrate von 69 % durch die Operation (62). 29 Monate nach der Operation lebten noch 66 % der von Baron et al. operierten Patienten (3). Allerdings muß bei beiden Studien die geringe Patientenzahl erwähnt werden (13 bzw. 18 Patienten). Trotzdem konnte die Prognose von Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillusinfektion durch den chirurgischen Eingriff verbessert werden (3).

Die entsprechenden Patienten besitzen im Regelfall eine deutlich geschwächte Immunabwehr, und so können Läsionen meist nicht von selbst ausheilen. Diese Läsionen stellen für den Patienten eine ständige Infektionsquelle dar. Sie können durch eine chirurgische Behandlung reseziert werden, welche damit als Rückfallprophylaxe, insbesondere vor erneuten Neutropeniephasen, dienen kann (62). Weiterhin besteht durch den chirurgischen Eingriff die Möglichkeit einer schnellen Weiterbehandlung der hämatologischen Grunderkrankung durch Chemotherapie oder KMT (3).

Eine Aspergillose kann pulmonale Blutungen auslösen, welche in fulminanten Fällen lebensbedrohlich sein können. Die chirurgische Behandlung ist in der Lage, solche Blutungen zu verhindern (3).

Man sollte einen chirurgischen Eingriff in jedem Fall bei Auftreten von Hämoptysen und Läsionen, die sich auf die Bronchien und großen Gefäße ausdehnen, in Erwägung ziehen, sowie bei fokalen Fällen einer invasiven pulmonalen Aspergillusinfektion (15).

1.5 Prophylaxe von Pilzinfektionen

Zu allererst sollte ein hohes Maß an allgemeiner Hygiene eingehalten werden, um die Entstehung einer Pilzinfektion bei Risikopatienten zu verhindern. Dies beinhaltet z.B. das Händewaschen vor dem Umgang mit solchen Patienten, aber auch deren Unterbringung in speziellen Räumen mit Laminar-Air-Flow oder HEPA-Filtern (High-Efficiency Particulate) in der Luftversorgung (5, 16, 81). Allerdings können auch diese allgemeinen Schutzmaßnahmen eine Infektion nicht in jedem Fall verhindern, da immer wieder eine

bereits bestehende Besiedelung der Luftwege von Patienten mit verschiedenen Pilz Spezies, vor allem Aspergillen, beobachtet wird und die schon erwähnten Systeme der Luftversorgung dadurch wirkungslos werden. Weiterhin besteht für Patienten die Möglichkeit, sich bei diagnostischen oder therapeutischen Maßnahmen, die nicht in geschützten Räumlichkeiten durchgeführt werden, zu infizieren. Auch können Filteranlagen für das gehäufte Auftreten besonders von Aspergillosen verantwortlich sein, da Aspergillus Spezies auf Membranen solcher Anlagen siedeln und dadurch über das gesamte System weiterverbreitet werden können (81). Außerdem kommt es immer wieder einmal vor, daß sich Patienten auch nach ihrer Verlegung aus diesen speziellen Räumen oder nach ihrer Entlassung aus der stationären Behandlung noch infizieren. Dies gilt im Besonderen für Patienten nach KMT (78).

Als Chemoprophylaxe von Aspergillusinfektionen kamen und kommen folgende Therapieansätze zur Anwendung: niedrig dosierte Amphotericin B-Infusionen, Amphotericin B-Inhalationen oder –Sprays sowie die Gabe von Itraconazol (16).

Zwei Studien beleuchten den Nutzen und die Effektivität einer medikamentösen Prophylaxe der invasiven Aspergillusinfektion: Donnelly findet keine überzeugenden Argumente und Fakten für eine solche Prophylaxe. Ebenso stellt De Pauw die Effektivität derselben in Frage und berichtet von einer großen Ähnlichkeit der Ergebnisse bei Patienten mit und ohne medikamentöser Prophylaxe (16, 17).

Trotzdem sollte nach Meinung De Pauws bei Hochrisikopatienten eine medikamentöse Prophylaxe gegen invasive Mykosen durchgeführt werden, auch ohne ein für alle prophylaktischen Zwecke geeignetes Medikament. Er betont besonders die frühzeitige Gabe von Amphotericin B i.v. in therapeutischer Dosierung bei Hochrisikopatienten, vor allem dann, wenn ein Verdacht auf eine invasive Pilzinfektion besteht (16). Als Chemoprophylaxe invasiver Aspergillusinfektionen kann Itraconazol oder auch AmBisome eingesetzt werden (16, 73, 81).

Nun gibt es auch Patienten mit malignen hämatologischen Systemerkrankungen, die eine invasive Aspergillose durchgemacht haben und jetzt weitere Chemotherapiezyklen oder eine KMT bekommen sollen. Dies führt bei solchen Patienten aller Voraussicht nach zu erneuten Neutropeniephasen. Somit wäre es mittels einer Prophylaxe erstrebenswert, ein Wiederauftreten der invasiven Aspergillusinfektion zu verhindern. In einer retrospektiven Studie kamen Offner et al. zu dem Schluß, daß es durch eine effektive Behandlung der primären invasiven Aspergillusinfektion und eine anschließende Prophylaxe mit

Amphotericin B i.v., AmBisome i.v. oder Itraconazol möglich ist, das Rezidivrisiko zu senken (56).

Des weiteren konnten Karp et al. zeigen, daß eine klinisch signifikante Reaktivierung der invasiven Aspergillose erfolgreich durch eine Prophylaxe mit Amphotericin B i.v. und 5-Fluorocytosin verhindert wurde. Außerdem war man so in der Lage, eine weitere intensive antileukämische Behandlung durchzuführen (36). Während der Neutropenie ist es sinnvoll, als Rückfallprophylaxe nach durchgemachter invasiver Aspergillusinfektion Amphotericin B i.v. in therapeutischer Dosierung zu geben. In der Zeit dazwischen sollte Itraconazol zur Prophylaxe appliziert werden (16). Zusätzlich ermöglicht die zuvor erwähnte chirurgische Therapie, Infektionsfoci zu beseitigen und dadurch zur Rückfallprophylaxe beizutragen (3, 15, 62).

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war, die NASBA-Technologie bezüglich der sensitiven und spezifischen Extraktion, Amplifikation und Detektion von RNA verschiedener Aspergillus Spezies zu testen und entsprechend einzurichten. Weiterhin wurden auch andere Pilz Spezies, menschliche Fibroblasten sowie das Zytomegalovirus in bestimmten Versuchsreihen miteinbezogen. Die Arbeit diente gleichzeitig als Vorbereitung einer prospektiven Studie zum Vergleich des Nachweises von Aspergillus-RNA aus Blutproben mittels NASBA-Technologie mit den Ergebnissen anderer, bereits etablierter Nachweismethoden, vor allem jedoch mit den Ergebnissen einer schon vorbeschriebenen Aspergillus-PCR (27).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
NASBA-Gerät	NASBA-Reader (NASBA-QR-System)	Organon Teknika Niederlande
LightCycler-PCR-Gerät	LightCycler-PCR-Analysesystem	Roche Diagnostics Mannheim
Computer	Compaq Presario 433	Isotopenlabor Medizinische Klinik Tübingen
Drucker	LaserJet III	Hewlett Packard
Pipetten 5µl, 10µl, 100µl, 1000µl	Variopipetten	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Reaktionsgefäß-Ständer	Eppendorf-Ständer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	Relatec	Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Ultrazentrifuge 5402, 5415	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Reax 2000	Heidolph
Thermorüttler	1086	GFL
Wasserbad	Heizbad	Memmert Köttermann
Magnetic Particle Concentrator	MPC-6	Deutsche Dynal GmbH, Hamburg
Gelkammer	Horizon 11.14	GIBCO, BRL, Gaithersburg, USA

2.1.2 Kits, Primer, Gensonden und Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Bezeichnung	Bezugsquelle
Extraktions-Säulen	QIAShredder-Säulen	Qiagen, Hilden
Extraktions-Kit	Qiagen-RNA-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden
Amplifikations-Kit	Nuclisens-Amplifikations-Kit	Organon Teknika, Niederlande
Detektions-Kit	Nuclisens Detektions-Kit	Organon Teknika, Niederlande
Tissue Kit	QIAmp Tissue-Kit	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße	Eppendorf 1,0 ml Safe-Lock Falcon 50 ml	Eppendorf, Hamburg Becton Dickinson, USA
Primer	NASBA-Primer 1 NASBA-Primer 2 PCR-Primer 1 PCR-Primer 2	Roth, Karlsruhe Life Technologies, Schottland (PAGE-Aufreinigung) Isogen Bioscience BV, Maarsen (HPLC-Aufreinigung)
Sonden	NASBA-Sonde 1 PCR-Hybridisierungssonde 1 PCR-Hybridisierungssonde 2	Roth, Karlsruhe
Beads-Waschlösung	Basic Kit Beads-Buffer	Organon Teknika, Niederlande
NASBA-Reader-Lösungen	Assay-Buffer 1000 ml Cleaning-Solution 1000 ml	Organon Teknika, Niederlande
RNA-Secure	RNA-Secure	Ambion, Austin, USA
RNase-Zap	RNase-Zap	Ambion, Austin, USA
Desinfektionsmittel	Meliseptol	Braun AG, Melsungen

2.1.3 Chemikalien und andere Gebrauchsstoffe

Substanz	Bezugsquelle
Ampuwa-Wasser Nuklease-frei	Roche Diagnostics, Mannheim Fresenius, Bad Homburg
Ambion-Wasser Nuklease-frei	Ambion, Austin, USA
PCR-Wasser	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol 99,7%	Merck, Darmstadt
ß-Mercaptoethanol	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
Agarose	SIGMA, Deissenhofen
Rekombinante Lyticase	SIGMA, Deissenhofen
GelStar	FMC BioProducts, Rockland, USA
10 x TAE-Puffer	Gibco BML, Life Technologies
10 x Blue-juice-Marker, gel loading buffer	Gibco BML, Life Technologies
100 bp DNA-Leader, readyload	Invitrogen

2.1.4 Vewendete Pilzstämme und deren Herkunftsbezeichnung

Pilzstamm	Herkunftsbezeichnung
Aspergillus fumigatus	DSMZ 790
Aspergillus flavus	DSMZ 818
Aspergillus niger	DSMZ 737
Aspergillus versicolor	DSMZ 1943
Aspergillus glaucus	ATCC 14567
Scopulariopsis brevicaulis	DSMZ 1218
Curvularia inaequalis	DSMZ 62462
Absidia corymbifera	DSMZ 1144
Fusarium solani	DSMZ 1164
Rhizopus oryzae	DSMZ 905
Acremonium chrysogenum	DSMZ 880
Penicillium brevicompactum	DSMZ 3825
Penicillium chrysogenum	DSMZ 844
Alternaria alternata	DSMZ 1102
Candida albicans	DSMZ 1665

DSMZ=Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
ATCC=American Type Culture Collection

2.1.5 Primer und Gensonden

Primer	**Oligonukleotidsequenz (5' 3')**
NASBA-Primer 1	AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA GCA AAG GCC TGC TTT GAA CA
NASBA-Primer 2	GCC GCG GTA ATT CCA GCT CCA ATA
PCR-Primer 1	ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG
PCR-Primer 2	CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG
Sonde	**Oligonukleotidsequenz (5'-Biotin 3')**
NASBA-Sonde 1	GGT CCG CCT CAC CGC GAG TAC TG
PCR-Sonde 1	GTT CCC CCC ACA GCC AGT GAA GGC
PCR-Sonde 2	TGA GGT TCC CCA GAA GGA AAG GTC CAG C

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion der RNA

100 µl EDTA-Venenblut wurde den Patienten zweimal wöchentlich abgenommen und diente als Ausgangsmaterial für die RNA-Extraktion.

2.2.2 Zelllyse

Zu Beginn wurden die Arbeitsfläche und die Arbeitsmaterialien gründlich mit RNaseZap (Ambion, Austin, USA) gereinigt. Dadurch wurden möglicherweise vorhandene RNasen inaktiviert. Daraufhin wurden dem EDTA-Blut 300 µl RLT Lysispuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) zugesetzt. Dieser RLT Lysispuffer enthält Guanidin-Isothiocyanat und sorgt für eine umfassende Zelllyse. Der Ansatz wurde für 15-20 s in flüssigen Stickstoff eingebracht. Als nächstes folgte eine dreiminütige Inkubation bei 60°C und anschließend die Zugabe von 20 µl RNA Secure (Ambion, Austin, USA). Bei RNA Secure handelt es sich ebenfalls um ein Reagenz, welches eventuell vorhandene RNasen inaktiviert und damit als Schutz für RNA fungiert. Nun wurde der Ansatz für 20 min bei 60°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 660 µl RLT Lysispuffer zugesetzt.

2.2.3 Isolierung und Reinigung der RNA

Diese Arbeitsschritte wurden mit dem kommerziell erhältlichen RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Als erstes wurde der Ansatz auf eine QiaShredder-Säule (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben und für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. RNA-freies Zellmaterial wurde so herausfiltriert und der Durchfluß mit darin enthaltener RNA in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden dem Ansatz 330 µl Ethanol (96 bis 100 %) zugefügt. Weiterhin wurde der Ansatz auf eine Spin-Säule (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben, an welche die RNA bindet, und die beladene Säule für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Es folgten drei Waschschritte: zunächst wurden 700 µl RW1 Waschpuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) zugegeben und die Säule für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde abermals verworfen. Nun wurden 500 µl RPE Waschpuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) zugesetzt, die Säule für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Der dritte Schritt erfolgte nochmals mit 500 µl RPE Waschpuffer, und der Ansatz wurde dann für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Auch hier wurde der Durchfluß verworfen.

2.2.4 Eluierung der RNA

Die auf der Spin-Säule gebundene RNA wurde durch die Zugabe von 40 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland) und nachfolgender Zentrifugation für 1 min bei 10000 rpm eluiert. In einem weiteren Schritt wurden der Säule abermals 40 µl RNase-freies Wasser zugegeben. Erneut wurde für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert und damit eluiert.

Die beiden Eluate wurden gepoolt, so daß sich ein Gesamtvolumen von 80 µl ergab. Anschließend konnten diejenigen Eluate, die nicht sofort weiter bearbeitet wurden, bei –80°C aufbewahrt werden.

2.2.5 Alternative Möglichkeit der RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion konnte auch unter Verwendung des Isolationsmoduls durchgeführt werden, welches im NucliSens Basic Kit (Organon Teknika, Boxtel, Niederlande) enthalten ist. Hierbei wurden zu 100 µl Blutprobe 900 µl Lysispuffer (Organon Teknika,

Boxtel, Niederlande) gegeben und für 15 bis 20 s in flüssigen Stickstoff eingebracht. Danach folgte eine dreiminütige Inkubation bei 60°C. Des weiteren wurden 50 µl RNA Secure zugesetzt und für 20 min bei 60°C im Thermoblock inkubiert. Nun wurden gemäß der Bedienungsanleitung des Kits 20 µl Silica-Suspension (Organon Teknika, Boxtel, Niederlande) zugegeben, welche zum Binden vorhandener RNA diente. Daraufhin erfolgte die Reinigung der RNA, wobei jeweils zweimal mit 1 ml Waschpuffer (Organon Teknika, Boxtel, Niederlande) und 1 ml Ethanol (70 %) und einmal mit 1 ml Aceton gewaschen wurde. Als nächstes wurde die RNA mittels 50 µl Elutionspuffer (Organon Teknika, Boxtel, Niederlande) eluiert und bei −80°C aufbewahrt.

Um die Anwesenheit von RNA zu überprüfen, wurden 23 Extrakte mittels des Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche Molecular Biochemicals) untersucht. Das Verfahren besteht in einer AMV (avian myeloblastosis virus)-Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR), bei der Taq Polymerase zur Bildung des + Strangs und Pwo Polymerase für den PCR-Schritt zum Einsatz kommen, wie bei Mallet et al. beschrieben (49). Alle Proben wurden DNase I (RNase-frei; Roche Molecular Biochemicals) für 1 h bei 37°C ausgesetzt, die PCR wurde wie vormals beschrieben durchgeführt (45).

Amplifikate wurden durch Gel-Elektrophorese (2 % Agarose in TAE) nachgewiesen und mittels GelStar DNA-Färbung (FMC Bioproducts, Hessisch Oldendorf, Deutschland) sichtbar gemacht.

2.2.6 Amplifikation der RNA

Die Amplifikation der RNA wurde mittels des Amplifikationsmoduls aus dem NucliSens Basic Kit durchgeführt. Ein Standard-Reaktionsansatz enthält T7-RNA-Polymerase (T7 RNA Pol), RNase H, AMV-Reverse Transkriptase (RT), Nukleosidtriphosphate, zwei spezifische Primer und geeignete Pufferkomponenten, vor allem in Form von Kaliumchlorid. Primer 1 ist 47 Basen lang und besitzt 22 Basen an seinem 3'-Ende. Diese sind komplementär zu dem 3'-Bereich der Zielsequenz. Am 5'-Ende dieses Primers befindet sich eine Promotorsequenz, die durch die T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Primer 2 hat eine Länge von 24 Basen, die sich von dem gegenüberliegenden Bereich der Zielsequenz ableiten (in 5'-Richtung).

Das NASBA-System ist in der Lage, direkt spezifische Sequenzen einzelsträngiger RNA zu amplifizieren. Hierbei wird die zuvor isolierte RNA (RNA-Template, + Strang) dem oben beschriebenen Standard-Reaktionsansatz zugesetzt. Der Prozeß der RNA-

Amplifikation läuft dann nach folgendem Muster ab: Primer 1 lagert sich an die RNA-Zielsequenz. Die AMV-Reverse Transkriptase verwendet die Desoxynukleosidtriphosphate, die ebenfalls im Ansatz sind, zur Verlängerung des 3'-Endes von Primer 1. Hierdurch werden eine cDNA-Kopie des RNA-Templates sowie ein RNA:DNA-Hybrid gebildet. Die RNase H hydrolisiert nun die RNA des RNA:DNA-Hybrids und baut also die ursprüngliche RNA ab. Demzufolge bleibt eine einzelsträngige DNA (– Strang) zurück, an die sich Primer 2 anlagert. Jetzt synthetisiert die Reverse Transkriptase einen zweiten DNA-Strang. Infolgedessen liegt eine doppelsträngige DNA (ds DNA) mit doppelsträngiger Promotorregion vor.

Des weiteren transkribiert die T7-RNA-Polymerase als drittes Enzym im Reaktionsansatz nun RNA-Kopien (– Strang) vom jetzt transkriptionsaktiven Promotor. In diesem Zusammenhang dient der – Strang der DNA als Matrize. So werden mehr als 100 Kopien von jedem Template-Molekül hergestellt. Jedes so entstandene, neue RNA-Molekül kann im weiteren Verlauf des NASBA-Prozesses als Template für die Reverse Transkriptase verwendet werden. Dabei bindet Primer 2 zuerst an das Template und wird durch die Aktion der Reversen Transkriptase verlängert. Dadurch entsteht, wie zuvor beschrieben, ein RNA:DNA-Hybrid, und die RNase H hydrolisiert den RNA-Strang. Primer 1 bindet nun an die resultierende einzelsträngige DNA, und die Reverse Transkriptase synthetisiert DNA. Auf diesem Wege wird wiederum ein transkriptionsaktiver Promotor gebildet.

Die so amplifizierte RNA kann dann mittels verschiedener Methoden (z.B. SDS-Gelelektrophorese) nachgewiesen werden.

Obwohl der sequentielle Ablauf der RNA-Amplifikation beim NASBA-Prozeß hier gesondert dargestellt wurde, finden sämtliche Schritte simultan (in einem Reaktionsansatz bei konstanter Temperatur) statt.

Zur Durchführung der NASBA-Amplifikation der unter A. erhaltenen RNA wurde ein Reaktionsansatz mit 5 µl des zuvor hergestellten Eluats angesetzt. Dieser Ansatz enthielt weiterhin die benötigten Nukleotide, Magnesiumchlorid, Kaliumchlorid (Konzentration: 50 mM) und die beiden Primer. Primer 1 (5'-*AATTCTAATACGACTCACTATAGGG*-GAGCAAAGGCCTGCTTTGAACA, die T7-Promotorregion ist kursiv gedruckt und durch einen Bindestrich abgeteilt) und Primer 2 (5'-GCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATA) sind gemäß Protokoll des Basic Kit Amplification Moduls (Organon Teknika, Boxtel, Niederlande) zu jeweils 0,5 mM im Ansatz enthalten. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend für weitere 5 min bei 41°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 5 µl

Enzymlösung (AMV-RT, RNase H, T7-RNA-Polymerase, BSA (bovine serum albumin) und Sorbitol) zugegeben, und der Reaktionsmix wurde für 90 min bei 41°C zur isothermalen Amplifizierung der Pilz-RNA inkubiert.

2.2.7 Detektion der amplifizierten RNA

Um das Produkt der Amplifikation aus 2.2.6 nachzuweisen, wurden folgende Detektionsreagenzien präpariert: die Sonde (ein Nukleinsäuremolekül mit der Nukleotidsequenz 5'-GGTCCGCCTCACCGCGAGTACTG) wurde biotinyliert und an Streptavidin-beschichtete Kügelchen gekoppelt. Die Kügelchen-Sonden-Suspension wurde bis zur Ausbildung einer dunkelgefärbten Lösung gevortext. Diese Lösung wurde daraufhin mit einer generischen Ruthenium-markierten ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Sonde im Verhältnis 1:1 vermischt.
Nun wurden 5 µl des unter 2.2.6 erhaltenen verdünnten Amplifikationsproduktes (im Verhältnis 1:10) zu 20 µl der Kügelchen-Sonden-Mischung gegeben und für 30 min bei 41°C inkubiert. Im Anschluß daran wurden diesem Hybridisierungsansatz 300 µl des Assaypuffers (Organon Teknika, Boxtel, Niederlande) zugesetzt, und es wurde die ECL-Reaktion im NucliSens-Reader durchgeführt, wie in „Gudibande, S.R., J.H. Kenten, J. Link, K. Friedman, R.J. Massey, 1992, Rapid, non-separation electrochemiluminescent DNA hybridization assays for PCR products, using 3'-labeled oligonucleotide probes, Mol. Cell. Probe, 6, 495-503", beschrieben. Im NucliSens-Reader findet automatisch eine Separation statt zwischen Sonden, die mit der nachzuweisenden RNA Hybride gebildet haben, und freien Sonden, die nicht reagiert haben. Die Intensität der gemessenen Lumineszenz wird in sog. ECL-Counts umgerechnet und ist dabei proportional zur vorhandenen Pilz-RNA im Reaktionsansatz. So ist es möglich, den qualitativen und unter Umständen sogar quantitativen Nachweis von Pilz Spezies in der untersuchten Probe zu führen.

2.2.8 Durchführung der PCR

Damit die Ergebnisse des NASBA-Verfahrens mit denen einer konventionellen PCR verglichen werden konnten, wurde parallel bei einigen der Ansätze eine quantitative Light-Cycler-PCR (LC-PCR) eingesetzt. Diese führte Frau Kumbier, Mitarbeiterin im Labor von Herrn Prof. Einsele, Medizinische Universitätsklinik Tübingen, durch;

Ausgangspunkt waren hier Aspergillus fumigatus-Verdünnungsreihen sowie Blutproben von gesunden Freiwilligen, denen unverdünnt DNA weiterer Pilz-, Virus- und Bakterien Spezies bzw. menschlicher Fibroblasten zugegeben wurde. Die DNA wurde *extrahiert* wie vormals beschrieben (45), unter Verwendung der rekombinanten Lyticase (SIGMA, Deissenhofen, Deutschland) und dem QIAmp Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Weiterhin wurden die Ansätze standardmäßig RNase-behandelt.
Für die DNA-*Amplifikation* wurden Primer (5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG, 5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG, Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, die an konservierte Bereiche des Pilz 18S-rRNA-Gens binden. Die Durchführung der PCR fand als real-time PCR im Light-Cycler-Gerät wie beschrieben statt (45).
Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen zwei verschiedenen spezifischen Sonden bildete die Basis für das *Detektionssystem*. Die Hybridisierungssonde 1 (5'-GTT CCC CCC ACA GCC AGT GAA GGC) war mit Fluorescein, die Hybridisierungssonde 2 (5'-TGA GGT TCC CCA GAA GGA AAG GTC CAG C) mit Light-Cycler-Red 640 markiert. Ferner waren beide Sonden Aspergillus-gattungsspezifisch und konnten in Kopf-zu-Schwanz-Anordnung hybridisieren, wodurch die beiden fluoreszierenden Farbstoffe in unmittelbare Nähe gebracht wurden. Kam es nun zu einem Energietransfer zwischen den beiden Sonden, so resultierte die Emission eines rot fluoreszierenden Lichts, das durch Photohybride gemessen werden konnte.

2.2.9 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen im Umgang mit RNA/DNA

Um das Risiko von Kontaminationen so weit wie möglich zu reduzieren, wurden im Zusammenhang mit der NASBA-Methode der Extraktionsschritt, der Amplifikationsschritt und der Detektionsschritt, wie auch die PCR in getrennten Räumen durchgeführt. Außerdem wurden ausschließlich für diese Zwecke eingesetzte Arbeitsmaterialien und –geräte (Pipetten, Pipettenspitzen, Gefäße, usw.) benutzt. Personen, die mit NASBA bzw. der PCR arbeiteten, trugen Gesichtsmasken, sterile Handschuhe und Einmal-Arbeitskittel. Zusätzlich durften sie sich nicht am selben Tag vom Detektionsraum in den Extraktionsraum bewegen.

2.3 Charakterisierung des Patientengutes

2.3.1 Stellenwert im Gesamtverlauf der Arbeit

Diese Arbeit war als methodische Arbeit angelegt; das Ziel bestand darin herauszufinden, ob sich die NASBA-Technologie für die sensitive und spezifische Extraktion, Amplifikation und Detektion von RNA verschiedener Aspergillus Spezies eignet. Außerdem wurden die Versuche auch auf andere Pilz Spezies, menschliche Fibroblasten sowie das Zytomegalovirus ausgedehnt. Während der ersten Phase der Arbeit wurden Verdünnungsreihen mit einer bekannten Menge an Aspergillus fumigatus–Konidien (10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 und 10^1 CFU/ml Lösung) verwendet. Aspergillus fumigatus-Kulturen (DSMZ 790) wurden hierzu durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ) bereitgestellt und auf Sabouraud-Glukose-Agar für 72 h bei 30°C kultiviert. Aspergillus fumigatus-Verdünnungsreihen wurden mit Hilfe steriler Kochsalzlösungen (Dichte von 0,5 nach McFarland-Standard (entspricht 10^6 CFU (Colony Forming Units)/ml)) hergestellt.

In der zweiten Phase der Arbeit sollte die Methode dann auf die Extraktion, Amplifikation und Detektion von Aspergillus-RNA aus menschlichem EDTA-Blut erweitert werden; es galt, die untere Nachweisgrenze des NASBA-Verfahrens zu bestimmen sowie den Einfluß des Blutes auf die Beständigkeit bzw. den Zerfall von RNA zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurde Blut von gesunden Freiwilligen mit Aspergillus fumigatus-Konidien (10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 CFU/ml Blut) beimpft.

Die dritte Phase der Arbeit beschäftigte sich schließlich mit dem Vergleich der NASBA-Technologie mit einer vorbeschriebenen real-time PCR (45) bezüglich der Detektion einer invasiven Aspergillusinfektion bei ausgewählten Patienten mit malignen hämatologischen Systemerkrankungen. Diese Patienten waren Teilnehmer einer prospektiv randomisierten Studie mit liposomalem Amphotericin B (AmBisome) nach allogener KMT. Es sollte untersucht werden, ob eine invasive Aspergillose mittels NASBA nachgewiesen werden kann, und wenn ja, in welchem zeitlichen Zusammenhang das NASBA-Ergebnis zu dem der PCR steht. Dies scheint insbesondere vor dem Hintergrund bedeutsam, daß bisher eine Frühdiagnostik einer invasiven Aspergillusinfektion mit anderen sensitiven und spezifischen Nachweismethoden nicht möglich war.

Die Anzahl der Patienten war sehr gering, und es fand keine Randomisierung statt; außerdem wurde keine statistische Aussage angestrebt.

Die vorliegende Arbeit war eher als Pilotprojekt für weitere Patientenstudien gedacht. Die Frage nach der generellen Möglichkeit, das NASBA-Verfahren in der Frühdiagnostik von invasiven Aspergillosen einzusetzen, sollte beantwortet werden.

2.3.2 Klinische Daten/Befunde/Verläufe

Den Patienten wurde im Rahmen der AmBisome-Studie zweimal wöchentlich Blut abgenommen; es handelte sich hierbei zum überwiegenden Teil um Patienten, die aufgrund einer malignen hämatologischen Systemerkrankung eine allogene Knochenmarktransplantation bekommen hatten. Zusätzlich wiesen sie auf eine invasive Aspergillose hindeutende klinische Daten wie Fieber, Neutropenie und Befunde in der Bildgebung auf.

Es wurden insgesamt 4 Patienten betrachtet, die allesamt in der Universitätsklinik Tübingen behandelt wurden. Das Geschlechtsverhältnis betrug 3 Männer und 1 Frau.

Das durchschnittliche Alter betrug 45 Jahre, der jüngste Patient war 32, der älteste Patient 59 Jahre alt.Von den 4 untersuchten Patienten hatten 2 Patienten eine akute myeloische Leukämie, 1 Patient hatte eine akute lymphatische Leukämie und 1 Patient ein Myelodysplastisches Syndrom.

3 Patienten erhielten eine allogene Knochenmarktransplantation, weiterhin war bei 1 Patient ein HLA-identischer Familienspender vorhanden. Bei 2 Patienten wurde eine HLA-idente Fremdspendertransplantation durchgeführt.

In der Vorgeschichte von allen 4 Patienten fand sich eine invasive Pilzinfektion, wobei diese nur bei 1 Patient sicher nachgewiesen war. Hingegen bestand bei 3 Patienten lediglich der Verdacht auf eine invasive Pilzinfektion. Unter Verdacht ist in diesen Fällen zu verstehen, daß antibiotikaresistentes Fieber unklarer Genese sowie pilzverdächtige pulmonale Areale in der radiologischen Bildgebung zu verzeichnen waren.

1 Patient mit nachgewiesener invasiver Aspergillose wurde im Rahmen der AmBisome-Studie zunächst mit liposomalem Amphotericin B (AmBisome) in der Dosierung 5 mg/kg Körpergewicht behandelt, wurde aber nach deutlicher Exazerbation der Aspergillusinfektion auf eine orale Therapie mit Voriconazol (Dosierung 2 x 200 mg/Tag) umgestellt. Bei 2 weiteren Patienten wurde auf die Gabe von AmBisome (Dosierung 3 mg/kg Körpergewicht) eine Stabilisierung bzw. ein Rückgang der pilzverdächtigen Befunde beobachtet; daraufhin wurde in beiden Fällen die antimykotische Therapie

überlappend mit Itraconazol oral (Dosierung 2 x 200 mg/Tag) fortgeführt. 1 Patient wurde ausschließlich mit AmBisome behandelt; die Dosierung lag bei 1 mg/kg Körpergewicht.
Des weiteren führte man bei 3 Patienten eine Prophylaxe gegen eine GvHD durch; hierbei kamen folgende Medikamente zum Einsatz: alle 3 erhielten Cyclosporin A (CSA) in einer Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht, 1 Patient wurde zusätzlich mit Decortin H (Dosierung 2 mg/kg/Tag), 1 anderer Patient mit Solu-Decortin (Dosierung 3 mg/kg/Tag) behandelt.Im Verlauf ihres Krankenhausaufenthalts entwickelten 3 Patienten eine akute GvHD Grad 1. 3 Patienten wurden mit Steroiden (Decortin H) therapiert, wobei die Dosierung bei 2 Patienten unter 1 mg/kg Körpergewicht, bei 1 Patient über 1 mg/kg Körpergewicht lag. 1 Patient bekam Neupogen.

3 Ergebnisse

3.1 Kontrolle der Methodik

3.1.1 Sensitivitätskontrolle

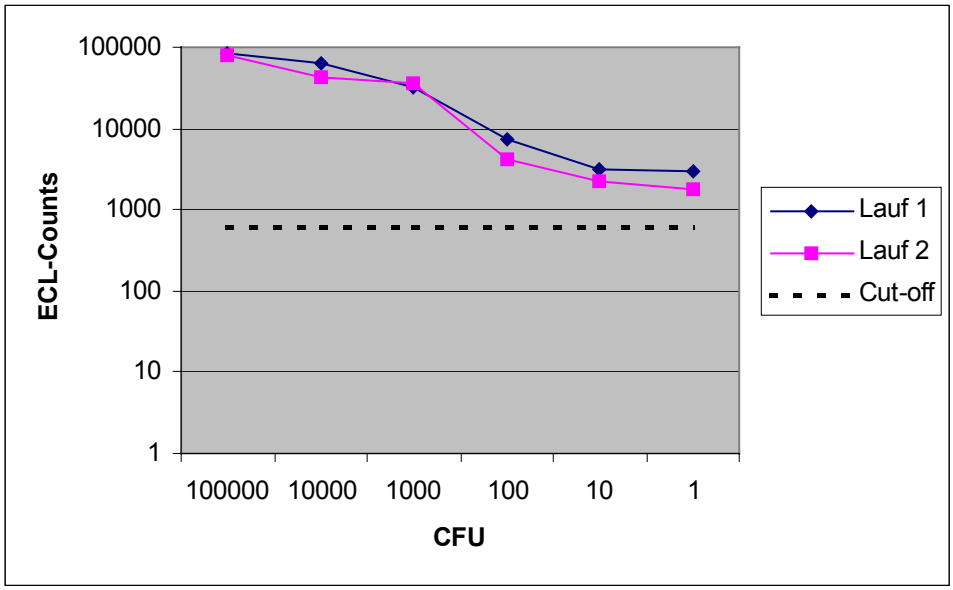
Um die Sensitivität des NASBA-Verfahrens zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen mit bekannter Zahl an Aspergillus fumigatus-Konidien verwendet (10^6-10^1 CFU/ml, in serieller Reihenfolge). Dabei konnte als untere Nachweisgrenze 1 CFU gefunden werden; diese Sensitivität wurde in darauffolgenden Versuchen regelmäßig bestätigt.
Die nachfolgende Tabelle stellt die Meßergebnisse des NASBA-Verfahrens denen der konventionellen LC-PCR gegenüber:

Tabelle 1: ECL-Counts in NASBA (28 Läufe)/LC-PCR-Ergebnisse bei Verdünnungsreihe mit bekannter Menge an Aspergillus fumigatus-Konidien

Menge an Asp. fumigatus-Konidien	ECL-Counts in NASBA Mittelwert + Standardabweichung	LC-PCR (CFU/ml) Mittelwert + Standardabweichung
10^5 CFU	82841 / 52282	100650 / 38112
10^4 CFU	61770 / 46673	11230 / 5416
10^3 CFU	32901 / 18073	990 / 523
10^2 CFU	7201 / 11412	125 / 68
10^1 CFU	3133 / 3067	9,3 / 0,1
1 CFU	2891 / 3450	Negativ
ddH_2O	90 / 66	Negativ

ddH_2O = zweifach destilliertes Wasser

Abbildung 1: ECL-Counts in NASBA bei Verdünnungsreihe mit bekannter Menge an Aspergillus fumigatus-Konidien (2 Beispielläufe)



Der Cut-off der NASBA-Methode wurde auf Empfehlung von Organon Teknika, Boxtel, Niederlande, auf 600 ECL-Counts festgelegt; dieser Wert gab an, bis zu welcher Zahl an gemessenen Counts eine Probe als negativ zu werten sei. Demnach wurden alle Proben mit gemessenen ECL-Counts von weniger als 600 als negativ, solche mit mehr als 600 Counts als positiv betrachtet.

3.1.2 Spezifitätskontrolle

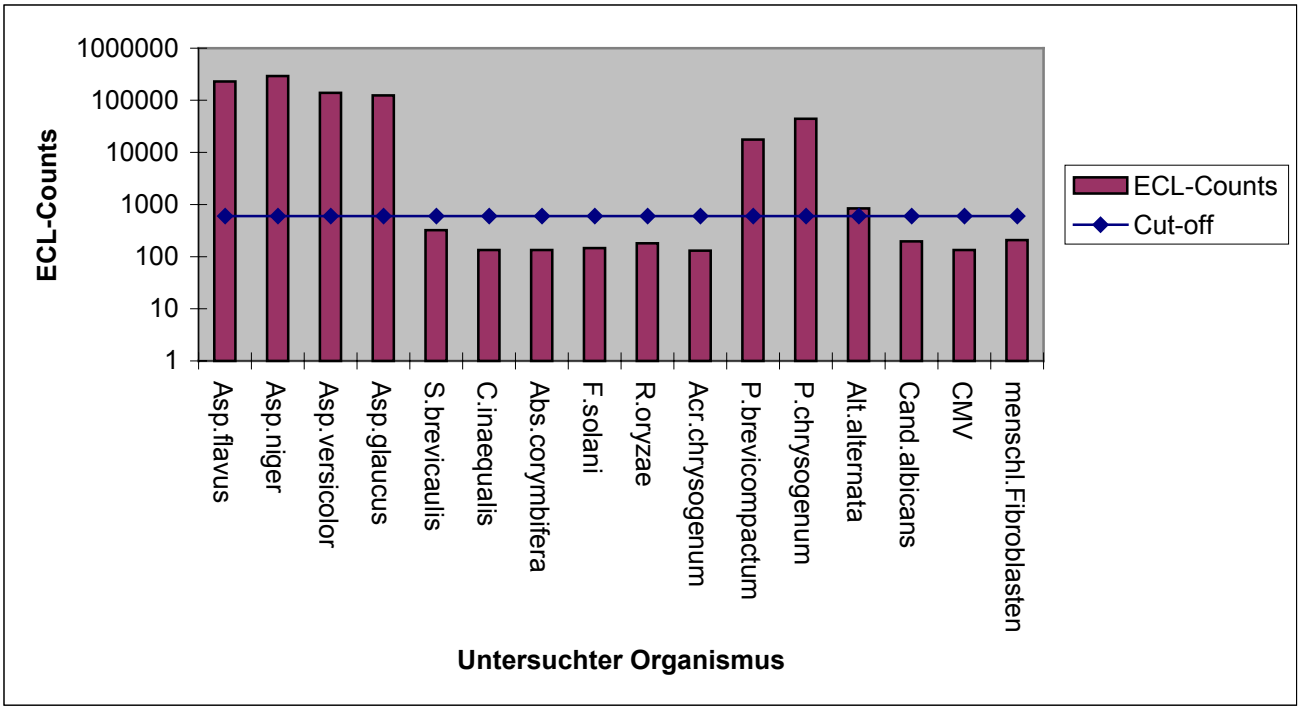
Da später im klinischen Alltag einer ausreichend hohen Spezifität eine herausragende Bedeutung zukommt, sollten eventuelle Kreuzreaktionen der Aspergillus Spezies-spezifischen NASBA-Oligonukleotidsonde über Aspergillus fumigatus hinaus mit anderen Pilz Spezies untersucht werden. Hierzu wurde RNA aus Kulturen von *Aspergillus flavus* (DSMZ 818), *Aspergillus niger* (DSMZ 737), *Aspergillus versicolor* (DSMZ 1943), *Aspergillus glaucus* (ATCC 14567), *Scopulariopsis brevicaulis* (DSMZ 1218), *Curvularia inaequalis* (DSMZ 62462), *Absidia corymbifera* (DSMZ 1144), *Fusarium solani* (DSMZ 1164), *Rhizopus oryzae* (DSMZ 905), *Acremonium chrysogenum* (DSMZ 880), *Penicillium brevicompactum* (DSMZ 3825), *Penicillium chrysogenum* (DSMZ 844) und *Alternaria alternata* (DSMZ 1102), sowie RNA von *Candida albicans* (DSMZ 1665), *Zytomegalovirus* und *menschlichen Fibroblasten* von gesunden Personen in unverdünnter Form eingesetzt.

Dabei detektierte die NASBA-Sonde zuverlässig RNA von Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus versicolor, Aspergillus glaucus und Aspergillus niger. Darüber hinaus fand sich eine Kreuzreaktivität der Sonde mit RNA von Penicillium brevicompactum, Penicillium chrysogenum und Alternaria alternata. Kein Signal ergab die RNA-Analyse von Scopulariopsis brevicaulis, Curvularia inaequalis, Absidia corymbifera, Fusarium solani, Rhizopus oryzae und Acremonium chrysogenum, sowie von Candida albicans. Außerdem reagierte die NASBA-Sonde nicht mit RNA von Zytomegalovirus und menschlichen Fibroblasten.

Tabelle 2: ECL-Counts in NASBA/LC-PCR-Ergebnisse bei Einsatz verschiedener Pilz Spezies sowie Zytomegalovirus und menschlicher Fibroblasten

Untersuchter Organismus	ECL-Counts in NASBA	LC-PCR-Meßergebnis
Aspergillus flavus	230117	nicht untersucht
Aspergillus niger	293710	nicht untersucht
Aspergillus versicolor	138254	nicht untersucht
Aspergillus glaucus	123072	nicht untersucht
Scopulariopsis brevicaulis	325	Negativ
Curvularia inaequalis	134	Negativ
Absidia corymbifera	134	Negativ
Fusarium solani	146	Negativ
Rhizopus oryzae	180	Negativ
Acremonium chrysogenum	130	Negativ
Penicillium brevicompactum	17519	Positiv
Penicillium chrysogenum	44226	Positiv
Alternaria alternata	844	Positiv
Candida albicans	196	Negativ
Zytomegalovirus	134	Negativ
menschliche Fibroblasten	209	Negativ

Abbildung 2: ECL-Counts in NASBA bei Einsatz verschiedener Pilz Spezies sowie Zytomegalovirus und menschlicher Fibroblasten



3.1.3 Positiv-/Negativkontrollen

Bei jedem NASBA-Lauf wurde eine Probe mit schon vormals extrahierter und mittels RT-PCR nachgewiesener Aspergillus fumigatus-RNA als *Positivkontrolle* mitgeführt (verwendet wurden dabei Extrakte aus Verdünnungsreihen mit 10^3-10^6 Aspergillus fumigatus-Konidien/ml Lösung); diese ergab bei allen Läufen ein positives Signal und zeigte damit eine erfolgreiche Amplifikation und eine erfolgreiche Hybridisierung mit der Aspergillus Spezies-spezifischen Sonde an.

Für die *Negativkontrolle* wurde Wasser verwendet, welches bei jedem NASBA-Lauf dazu dienen sollte, eventuelle Kontaminationen während der Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte anzuzeigen. Die Wasserprobe ergab in insgesamt 28 Läufen einen Mittelwert von 90 ECL-Counts mit einer Standardabweichung von 66 ECL-Counts und fiel in allen Versuchen negativ aus.

3.1.4 Kein Nachweis von genomischer Aspergillus-*DNA* mittels NASBA

Es sollte untersucht werden, ob ein eventuelles Vorhandensein kontaminierender Aspergillus-DNA in der Probe in irgendeiner Form Auswirkungen auf das Testergebnis hätte. Hierzu wurden Aliquote von bereits früher extrahierter Aspergillus-Nukleinsäure mit DNase-freier RNase (Roche Molecular Biochemicals) für 1 h bei 37°C inkubiert. Diese Aliquote wurden dann durch das NASBA-Verfahren analysiert und führten zu ECL-Signalen, die zu denen der Negativkontrolle keinerlei Unterschied aufwiesen. Folglich wurde genomische DNA mittels der NASBA-Methode nicht erfaßt.

3.2 Verwendung von Blut als Probenmaterial

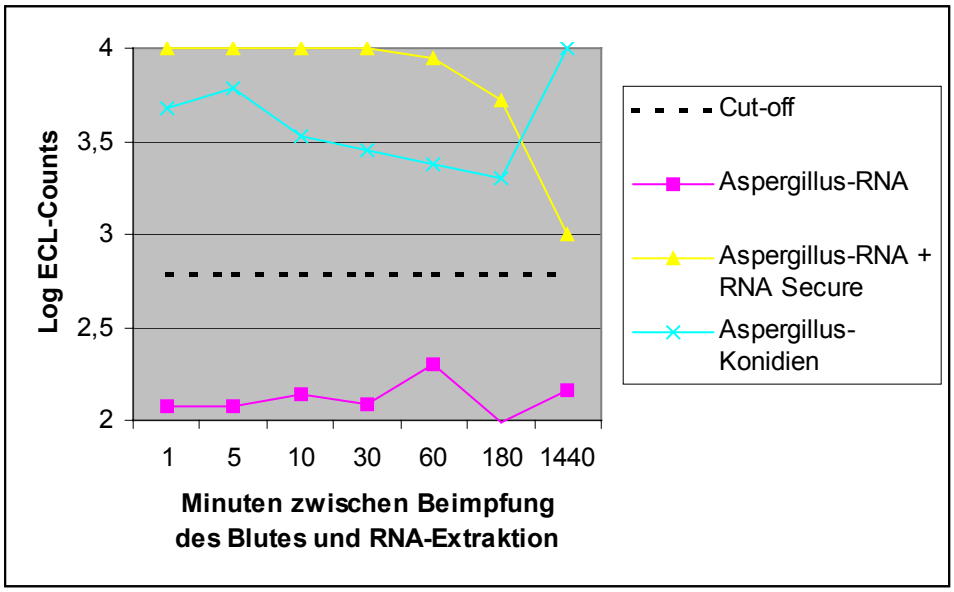
Es galt herauszufinden, ob mögliche im menschlichen Blut vorhandene Hemmstoffe in irgendeiner Form Einfluß auf die verschiedenen Arbeitsschritte innerhalb des NASBA-Verfahrens ausübten; hiervon konnten sowohl der Extraktions-, als auch der Amplifikations- bzw. der Detektionsprozeß betroffen sein. Folglich wurde Blut von gesunden Personen mit einer bekannten Menge an Aspergillus fumigatus-Konidien (10^6-10^1 CFU/ml Blut) beimpft. Dieses wurde im Zusammenhang mit NASBA bei insgesamt 28 Läufen als Ausgangsmaterial verwendet. Es zeigte sich bei allen Läufen bis hin zur geringsten eingesetzten Menge an Aspergillus fumigatus-Konidien ein positives Ergebnis. Diese Tatsache demonstrierte eindrucksvoll die Robustheit der NASBA-Methode gegenüber den unterschiedlichsten Störeinflüssen von seiten des Blutes.

3.2.1 Beständigkeit von RNA in Blut

Weiterhin war die Frage von Interesse, mit welcher Geschwindigkeit RNA in menschlichem Blut zerfallen würde und welchen Einfluß der Einsatz von RNA Schutzpuffer (RNA Secure) auf diesen Zerfallsvorgang hätte. RNA Secure ist, wie bereits erwähnt, ein Reagenz, das eventuell vorhandene RNasen inaktivieren und die RNA somit schützen soll. Hierzu wurde erneut Blut von gesunden Freiwilligen entweder mit Aspergillus fumigatus-Konidien (10^4 CFU/ml Blut) oder mit früher extrahierter Aspergillus fumigatus-RNA beimpft. ECL-Counts wurden daraufhin in festgelegten zeitlichen Abständen jeweils mit und ohne Einsatz von RNA Secure gemessen.

War RNA Secure verwendet worden, so konnten sowohl Konidien als auch RNA 1, 5, 10, 30, 60, 180 min und 24 h nach Beimpfung des Blutes detektiert werden.
Ohne RNA Secure waren hingegen nur Aspergillus fumigatus-Konidien auch 24 h nach Beimpfung des Blutes noch nachweisbar. Bei Beimpfung mit RNA allein konnten keine ECL-Counts gemessen werden; dies war mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen zügigen Zerfall der RNA im Blut zurückzuführen.

Abbildung 3: Einfluß der Zeitspanne zwischen Beimpfung des Blutes und Extraktion auf die Menge an detektierbarer Aspergillus fumigatus-RNA

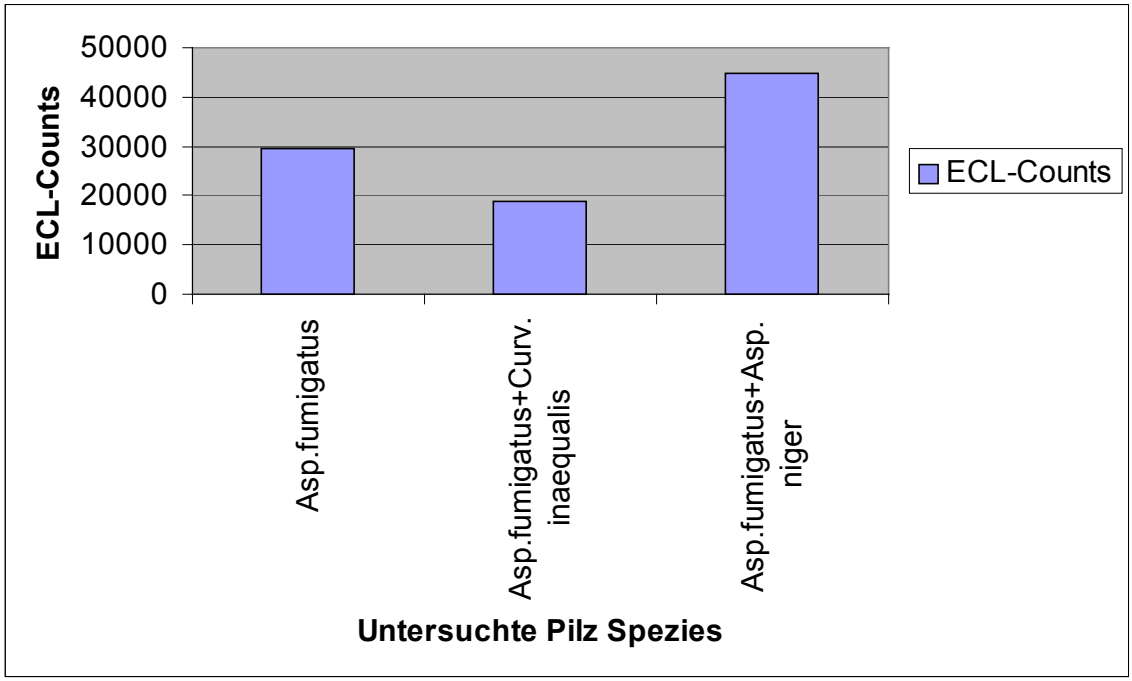


3.2.2 Einfluß von Koinfektionen auf die Sensitivität/Spezifität der NASBA-Methode

Um klären zu können, ob Infektionen mit zwei oder mehreren Pilz Spezies gleichzeitig die Ergebnisse von NASBA beeinflußten, wurden nun Blutproben mit Konidien von Aspergillus fumigatus und Curvularia inaequalis, einer Pilz Spezies, die nicht durch die NASBA-Sonde detektiert wurde, beimpft (jeweils 10^3 CFU/ml Blut). Nach Durchführung eines solchen Experiments zeigte sich lediglich eine minimale Reduzierung der gemessenen ECL-Counts (18760 Counts) im Vergleich zu Proben, die ausschließlich mit Aspergillus fumigatus-Konidien versetzt worden waren (29575 Counts).

Wurden simultan Aspergillus fumigatus- und Aspergillus niger-Konidien (jeweils 10^3 CFU/ml Blut) zugegeben, so erhöhten sich die gemessenen ECL-Counts um 15097, verglichen mit den Counts, die bei alleiniger Beimpfung mit Aspergillus fumigatus-Konidien gemessen worden waren.

Abbildung 4: ECL-Counts in NASBA bei kombiniertem Einsatz verschiedener Pilz Spezies



3.3 Ergebnisse von NASBA bzw. der LC-PCR bezüglich Patientenproben

Den Patienten wurde zweimal wöchentlich 1 Röhrchen EDTA-Venenblut abgenommen; dieses diente als Ausgangsmaterial sowohl für NASBA als auch für die LC-PCR.

3.3.1 Patient 1

Patient 1 wurde regelmäßig mittels NASBA sowie der LC-PCR im Zeitraum 04.05.00 bis 25.08.00 untersucht. Es zeigten sich 1 positiver Befund in NASBA (07.08.00: 727 ECL-Counts) gegenüber 4 positiven Befunden in der LC-PCR (22.05.00: 9,9 CFU/ml; 31.05.00: 1,2 CFU/ml; 19.06.00: 1,1 CFU/ml; 26.06.00: 1,1 CFU/ml) während des Beobachtungszeitraumes.

Des weiteren wies Patient 1 11/99 und 03/00 Fieber und Neutropenie auf, eine Aspergillus-verdächtige Pneumonie wurde zum ersten Mal am 31.05.00 beschrieben. Daraufhin mußten 09/00 Teile der linken Lunge wegen Progredienz der pulmonalen Aspergillose entfernt werden; hierbei gelang der Nachweis von Aspergillus fumigatus in Kultur und histologisch. Zusätzlich konnte 10/00 ein erneuter Progreß der pulmonalen Aspergillose mittels CT nachgewiesen werden.

Tabelle 3: Zusammenfassung Befunde Patient 1

	Fieber, Neutropenie	Aspergillus-verdächt. Pneumonie	kultur./histolog. Aspergillus-Nachweis	LC-PCR	NASBA
11/99	+	-	-	-	-
03/00	+	-	-	-	-
04.05.00	-	-	-	-	-
22.05.00	-	-	-	+	-
31.05.00	-	+	-	+	-
19.06.00	-	-	-	+	-
26.06.00	-	-	-	+	-
07.08.00	-	-	-	-	+
25.08.00	-	-	-	-	-
09/00	-	-	+	-	-

+ = positiv/vorhanden, - = negativ/nicht vorhanden

3.3.2 Patientin 2

Patientin 2 wies im Beobachtungszeitraum 10.07.00 bis 31.10.00 2 positive NASBA-Befunde (27.07.00: 1941 ECL-Counts; 31.07.00: 1378 ECL-Counts) auf. Die LC-PCR zeigte bei dieser Patientin 3 positive Ergebnisse (07.09.00: 4,9 CFU/ml; 18.09.00: 1,7 CFU/ml; 25.09.00: 2,2 CFU/ml).

Außerdem wurde bei Patientin 2 02/99 und 03/00 Fieber bei Neutropenie bzw. unklarer Genese festgestellt; der Verdacht auf eine pulmonale Aspergillose wurde erstmals 04/00 beschrieben. 07/00 wurde dann erneut der Verdacht auf eine pulmonale und auch hepatolienale Aspergillose geäußert. Abgesehen von den positiven LC-PCR-Befunden konnte mikrobiologisch kein Nachweis von Aspergillus Spezies erbracht werden; mittels Bildgebung (CT 09/00) war ein solcher Nachweis ebenfalls nicht möglich.

Tabelle 4: Zusammenfassung Befunde Patientin 2

	Fieber, Neutropenie	Aspergillus-verdächt. Pneumonie	LC-PCR	NASBA
02/99	+	-	-	-
03/00	+	-	-	-
04/00	-	+	-	-
10.07.00	-	+	-	-
27.07.00	-	+	-	+
31.07.00	-	+	-	+
14.08.00	-	-	-	-
07.09.00	-	-	+	-
18.09.00	-	-	+	-
25.09.00	-	-	+	-
31.10.00	-	-	-	-

+ = positiv/vorhanden, - = negativ/nicht vorhanden

3.3.3 Patient 3

Patient 3 wurde zwischen 21.08.00 und 31.08.00 mittels NASBA und LC-PCR untersucht. Dabei fanden sich 1 positives NASBA-Ergebnis (21.08.00: 858 ECL-Counts) und kein positiver Befund in der LC-PCR.

Der Verdacht auf eine invasive Aspergillose wurde zunächst 03/97 und dann erneut 05/97 beschrieben. 05/97 waren in diesem Zusammenhang eine Pneumonie, Hauteffloreszenzen und ein positives Aspergillus-Antikörper-IgM aufgetreten. 08/00 wurde dann abermals der dringende Verdacht auf eine invasive Aspergillose geäußert, da nun Infiltrate im Sinne einer solchen im CT-Thorax sichtbar waren. Mehrfach durchgeführte Galaktomannan-Antigen-Tests auf Aspergillus verblieben jedoch stets negativ.

Tabelle 5: Zusammenfassung Befunde Patient 3

	Aspergillus-verdächt. Pneumonie	Aspergillus-Antikörper-IgM	CT-Thorax	LC-PCR	NASBA
05/97	+	+	-	-	-
21.08.00	-	-	+	-	+
26.08.00	-	-	+	-	-
31.08.00	-	-	+	-	-

+ = positiv/vorhanden, - = negativ/nicht vorhanden

3.3.4 Patient 4

Der Beobachtungszeitraum bei diesem Patienten dauerte vom 28.09.00 bis 08.01.01. Es zeigten sich 2 positive Befunde bei NASBA (05.10.00: 4177 ECL-Counts; 09.10.00: 792 ECL-Counts) und kein positives Ergebnis in der LC-PCR.

Im Rahmen einer Lungenoberlappen-Pneumonie 05/00 bestand bei diesem Patienten lediglich der Verdacht auf eine Pilzinfektion; sämtliche durchgeführten Untersuchungen (Röntgen-Thorax, CT, Blutkultur, Aspergillus-Galaktomannan-Antigen) verblieben negativ bzw. unauffällig.

Tabelle 6: Zusammenfassung Befunde Patient 4

	Aspergillus-verdächt. Pneumonie	LC-PCR	NASBA
05/00	+	-	-
28.09.00	-	-	-
05.10.00	-	-	+
09.10.00	-	-	+
21.10.00	-	-	-
08.01.01	-	-	-

+ = positiv/vorhanden, - = negativ/nicht vorhanden

4. Diskussion

Patienten mit hämatologischen Neoplasien und protrahierter Neutropenie nach Knochenmarktransplantation oder einer zytostatischen Chemotherapie sind einem immensen Risiko ausgesetzt, an einer systemischen Pilzinfektion zu erkranken.
In diesem Zusammenhang ist ein besonderes Augenmerk auf den Bereich der invasiven Aspergillosen zu richten, da diese bei solchen Patienten eine überaus hohe Mortalität besitzen. Zudem wurden sie in den letzten Jahren häufiger beobachtet (5, 14).
Im Hinblick auf die Wirksamkeit gegenüber Aspergillus Spezies stehen derzeit nur Amphotericin B und Itraconazol zur Verfügung (13, 14, 15, 40); Fluconazol weist hierbei keine zufriedenstellenden Ergebnisse auf. Neuere Vertreter aus der Gruppe der Triazole (Voriconazol, Posaconazol, Ravuconazol) besitzen zwar in bezug auf Wirkungsspektrum, Wirkpotenz, Bioverfügbarkeit und Nebenwirkungsrate deutliche Vorteile verglichen mit Amphotericin B bzw. Itraconazol, sind jedoch für den klinischen Einsatz noch nicht zugelassen.
Amphotericin B ist mit dem Problem erheblicher Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität und infusionsbedingte Akuttoxizität behaftet. Mit der Entwicklung einer liposomalen Zubereitungsform von Amphotericin B (AmBisome) konnten diese Nebenwirkungen zwar in ihrer Häufigkeit und Schwere bei vergleichbarer Wirksamkeit reduziert werden, die Therapie mit AmBisome ist allerdings sehr teuer.
Daher kommt einer möglichst frühzeitigen und verläßlichen Diagnose und einem damit verbundenen frühen Therapiebeginn eine entscheidende Bedeutung bei der Bekämpfung einer systemischen Aspergillusinfektion zu (1, 10, 77).
Daraus folgernd erscheint es sinnvoll, bestimmte Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer invasiven Aspergillose mittels einer sensitiven Nachweismethode engmaschig zu überwachen, um eine eventuelle Therapie zu einem frühstmöglichen Zeitpunkt einleiten zu können. Dies würde die Prognose der Patienten deutlich verbessern. Außerdem wäre man in der Lage, eine zielgerichtete antimykotische Therapie nur solchen Patienten zuteil werden zu lassen, die sie auch wirklich benötigen.
Mit der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Versuch unternommen, mittels der NASBA-Methode Aspergillus Spezies im Blut von Patienten nachzuweisen. Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der Etablierung und Einrichtung des NASBA-Verfahrens in bezug auf Aspergillus Spezies und sollte im Gesamtzusammenhang einer Vorbereitung für weitere Untersuchungen an Patienten mit NASBA gesehen werden.

Außerdem galt es, die Ergebnisse der NASBA-Methode mit den Ergebnissen anderer, bereits etablierter Nachweismethoden zu vergleichen. Ein spezielles Augenmerk wurde dabei auf die PCR im allgemeinen sowie auf eine schon vorbeschriebene Aspergillus-PCR (27) im besonderen gelegt.

4.1 Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

4.1.1 Ergebnisse von NASBA bez. Detektion von Aspergillus-RNA

Zunächst konnte gezeigt werden, daß mittels der NASBA-Technologie sensitiv und spezifisch Aspergillus-RNA nachgewiesen werden kann, die Nachweisgrenze beträgt diesbezüglich 1 CFU. Wie steht es in diesem Zusammenhang mit verschiedenen Aspergillus Spezies? Hierbei stellte sich eine gute und verläßliche Erkennung der klinisch relevanten Aspergillus Spezies durch die Sonde heraus, RNA aus anderen Pilz Spezies, aus Zytomegalovirus sowie aus menschlichen Fibroblasten wurde hingegen nicht detektiert. Erwähnenswert ist eine schwache Kreuzreaktivität der Sonde mit Penicillium brevicompactum und Penicillium chrysogenum sowie eine sehr schwache Kreuzreaktivität mit Alternaria alternata. Dies ist jedoch im Hinblick auf die Fragestellung wenig problematisch, da die kreuzreaktiven Pilz Spezies verstärkt nur bei Patienten mit HIV-Infektion im fortgeschrittenen Stadium sowie fast ausschließlich im nicht-europäischen Verbreitungsraum zu finden sind.
Weiterhin war die Frage von Interesse, ob Koinfektionen mit zwei oder mehreren Pilz Spezies bei ein und demselben Patienten einen Enfluß auf das Ergebnis des Verfahrens hätten. Dieses Experiment wurde mit Aspergillus fumigatus und Curvularia inaequalis, einem Pilz, der nicht durch die NASBA-Methode erkannt wird, durchgeführt. Es zeigte sich lediglich eine minimale Reduzierung bezüglich der ECL-Auszählung gegenüber einer Probe mit Aspergillus fumigatus allein. Bei gleichzeitiger Testung von Aspergillus fumigatus und Aspergillus niger konnte ein Anstieg der ECL-Counts gesehen werden, ebenfalls verglichen mit dem alleinigen Vorhandensein von Aspergillus fumigatus in der Probe. Dieser Sachverhalt demonstriert, daß eine Koinfektion mit Aspergillus und Nicht-Aspergillus Spezies die NASBA-Methode praktisch unbeeinflußt läßt. Damit würde auch Patienten, die sich im fortgeschrittenen Stadium einer speziellen Erkrankung, beispielsweise einer HIV-Infektion befinden und von verschiedenen Pilz Spezies infiziert sind, ein zuverlässiger Aspergillus-spezifischer Nachweis ermöglicht.

Um bewerten zu können, wie stabil die nachzuweisende RNA in Blutproben ist bzw. in welchem Umfang eine Degradation dieser RNA stattfindet, wurden Blutproben mit Aspergillus fumigatus-Konidien bzw. –RNA versetzt. Daraufhin wurden die ECL-Counts in Abhängigkeit der Zeit sowie des Vorhandenseins von RNA-Schutzpuffer (RNA Secure) gemessen, welche das Vorhandensein bzw. die Stabilität der RNA repräsentierten. Dabei stellte sich in Gegenwart von RNA-Schutzpuffer eine Nachweisbarkeit der Aspergillus-RNA bis mindestens 1440 min nach Zugabe heraus; ohne Schutzpuffer waren lediglich Aspergillus-Konidien zu detektieren. In diesem Zusammenhang ist von einer zügigen RNA-Degradation auszugehen. Folglich sollte nach Möglichkeit RNA-Schutzpuffer bei der Durchführung des NASBA-Verfahrens verwendet werden.

Außerdem zeigte sich, daß mittels der NASBA-Methode hochspezifisch RNA, nicht jedoch DNA amplifiziert und gemessen wird, ein eventuelles Vorhandensein kontaminierender DNA hätte also keinerlei Auswirkung auf das Testergebnis. Es kann daraus die Möglichkeit geschlossen werden, mittels NASBA die Transkriptionsaktivität in Pilzzellen zu untersuchen, da nur RNA und keine genomische DNA erfaßt wird.

4.1.2 Ergebnisse von NASBA bez. Patientenproben

Es wurden vier Patienten betrachtet, welche allesamt unter einer malignen Systemerkrankung litten und Teilnehmer einer prospektiv randomisierten Studie mit liposomalem Amphotericin B (AmBisome) nach allogener KMT waren. Zur vergleichenden Bewertung der NASBA-Ergebnisse wurden außer der LC-PCR noch verschiedene andere Befunde bzw. Parameter herangezogen. Hierbei handelte es sich um das Auftreten von Fieber, einer Neutropenie, einer Aspergillus-verdächtigen Pneumonie sowie eines positiven Tests auf Aspergillus-Antikörper-IgM. Auch der kulturelle bzw. histologische Nachweis von Aspergillus sowie ein Aspergillus-verdächtiger Befund im CT des Thorax waren von Bedeutung. Die jeweiligen Daten wurden darüber hinaus bei jedem Patienten in einen zeitlichen Zusammenhang gesetzt.

Zunächst muß betont werden, daß bei sämtlichen Patienten im zeitlichen Verlauf zumindest ein positives NASBA-Ergebnis verzeichnet werden konnte, die Tests mit der LC-PCR verblieben dagegen bei zwei Patienten durchweg negativ. Damit kann bereits auf eine höhere Sensitivität der NASBA-Methode geschlossen werden. Bei jenen Patienten, bei denen sowohl NASBA als auch die LC-PCR positive Befunde lieferte, wurde bei

einem Patienten das Ergebnis von NASBA zeitlich gesehen früher positiv, beim anderen Patienten die LC-PCR. Insgesamt jedoch ergab die LC-PCR bei den beiden beschriebenen Patienten zahlenmäßig mehr positive Resultate als das NASBA-Verfahren. Hieraus wäre zu folgern, daß die LC-PCR eine Aspergillus-Infektion, wenn sie sie denn nachweist, mit höherer Zuverlässigkeit im Vergleich zu NASBA nachweist.

Eine Aspergillus-verdächtige Pneumonie trat bei allen vier Patienten jeweils vor einem positiven Ergebnis bei NASBA auf; ebenso zeigten sich neutropenisches Fieber bei zwei Patienten und ein positiver Test auf Aspergillus-Antikörper-IgM bei einem Patienten deutlich vor dem Zeitpunkt, an dem die NASBA-Methode ein positives Resultat lieferte. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, daß Fieber bzw. eine Neutropenie meist im Anfangsstadium einer Infektion bei rascher Vermehrung der Erreger im Blut auftritt, auch das Aspergillus-Antikörper-IgM kann in dieser Phase normalerweise bereits nachgewiesen werden.

Demgegenüber sah man im CT des Thorax einen Aspergillus-verdächtigen Befund erst, nachdem NASBA eine Aspergillus-Infektion angezeigt hatte. Des weiteren gelang ein kultureller bzw. histologischer Nachweis von Aspergillus ebenfalls erst einige Zeit nach dem positiven NASBA-Ergebnis.

Trotz der recht kleinen Zahl an untersuchten Patienten kann zusammenfassend gesagt werden, daß die NASBA-Methode im Vergleich mit verschiedenen anderen diagnostischen Mitteln, insbesondere mit der LC-PCR, durchaus eine Möglichkeit darstellt, eine Infektion mit Aspergillus anzuzeigen. Im folgenden sollen nun die unterschiedlichen Nachweismethoden für Pilzinfektionen im allgemeinen und für Infektionen mit Aspergillus im besonderen in diesem Zusammenhang betrachtet werden.

4.2 Vergleich mit anderen modernen Nachweismethoden für Aspergillus Spezies

4.2.1 Blutkulturen

Wie hoch ist nun die Effektivität von Blutkulturen als Nachweismethode einer systemischen Pilzinfektion? Hierzu führten Kami et al. eine retrospektive Studie an 720 Patienten durch, bei denen zwischen 1980 und 1999 Blutkulturen angefertigt wurden. Unter diesen 720 Patienten waren 252 Patienten mit einer invasiven Pilzinfektion und zwar verursacht durch Candida (n=94), Aspergillus (n=91), Zygomycetes (n=34),

Cryptococcus (n=7), Trichosporon (n=11), Fusarium (n=1) sowie unbekannte Pilz Spezies (n=20). Das Ergebnis der Studie konnte wie folgt ermittelt werden: von den 94 Patienten mit invasiver Candidiasis hatten 20 Patienten positive Blutkulturen und von den 11 Patienten mit Trichosporonosis hatten 7 Patienten positive Blutkulturen. Die Sensitivität dieser Methode lag bei 1,1 %, 0 % und 14 % jeweils für den Nachweis von invasiver Aspergillose, Zygomycosis und Cryptococcosis. Die Autoren zeigten weiterhin einen zusätzlichen Rückgang der Sensitivität, wenn Patienten gleichzeitig einer antimykotischen Therapie unterzogen wurden. Demnach können Blutkulturen durchaus falsch-negative Resultate erzeugen, außer es ist möglich, eventuell vorhandene antimykotische Substanzen in den Kulturflaschen zu inaktivieren. Zusammenfassend betrachtet sind Blutkulturen nicht in der Lage, mit ausreichender Sicherheit und Zuverlässigkeit eine systemische Aspergillusinfektion anzuzeigen (33).

4.2.2 Serologische Nachweismethoden

4.2.2.1 Der Sandwich-ELISA zur Detektion von Aspergillus-Galactomannan

Stynen et al. fanden bei diesem Test als untere Nachweisgrenze für Galactomannan weniger als 1 ng/ml (68). Wurde Serum als Probenmaterial verwendet, so lag die Sensitivität bei 60-100 % und die Spezifität bei 81-98,7 % (9, 47, 70, 75). Die Rate falsch-positiver Resultate wird mit 8-15 % angegeben (9, 68, 71) und den positiven Vorhersagewert für das Vorliegen einer invasiven Aspergillusinfektion ermittelten Stynen et al. zu 83 % (61) bzw. 54 % (70), den negativen Vorhersagewert zu 95 % (70).
Darüber hinaus wurde bei diesem Nachweisverfahren eine Kreuzreaktivität mit Penicillium chrysogenum, Penicillium digitatum und Paecilomyces variotii beobachtet (71).
Der Galactomannan-ELISA besitzt bei ordinaler Interpretation der Befunde eine hohe Reproduzierbarkeit, allerdings können die Testresultate quantitativ nur unzuverlässig reproduziert werden. Die Interpretation der Antigenkonzentrationsveränderungen während verschiedener Läufe des Galactomannan-ELISA ist daher nicht mit letzter Sicherheit möglich (76).
Weiterhin konnte in der Studie von Stynen et al. gezeigt werden, daß die Antigenämie keinen transienten Charakter besaß. Zudem waren die Verläufe der Antigenkonzentrationen bei den einzelnen Patienten unterschiedlich (68).

Swanink et al. ermittelten in ihrer Spezifitätsstudie einen Wert von 15 % falsch-positiver Ergebnisse bei der Untersuchung von 40 Serumproben bakteriämischer Patienten mit hämatologischen Neoplasien. Hier wurde keine Korrelation dieser Resultate mit den Kulturergebnissen von spezifischen Mikroorganismen beobachtet. Des weiteren gab es keine Reaktion der Mikroorganismen mit dem Galactomannan-ELISA. Die falsch-positiven Ergebnisse waren jedoch reproduzierbar. So konnte der Grund für diese falsch-positiven Befunde nicht hinreichend geklärt werden (71).
Eine andere Studie kam zu der Aussage, daß keine falsch-positiven Ergebnisse auftreten, wenn zwei oder mehr konsekutive positive Proben betrachtet werden (61).
Der besagte ELISA ist als kommerzieller Test verfügbar; dieser Vorteil muß jedoch wieder relativiert werden, da auch die NASBA-Methode aus kommerziell erhältlichen Testkits besteht (44).
Mit dem Galactomannan-ELISA können nur Aspergillusinfektionen nachgewiesen werden, während NASBA prinzipiell viele unterschiedliche Pilz Spezies detektieren kann. Auch in diesem Falle ist ein alleiniger Einsatz des Tests bei mangelhafter Zuverlässigkeit im klinischen Alltag sicherlich nur im Zusammenhang mit einer weiterführenden Diagnostik, z.B. mittels CT, möglich (75).

4.2.2.2 Der Latex-Agglutinationstest

Als untere Nachweisgrenze des Latex-Agglutinationstests wurde ein Wert von 15 ng Galactomannan/ml ermittelt (68). Bei der Verwendung von Serum als Probenmaterial lag die Sensitivität zwischen 27,5 und 95 % und die Spezifität zwischen 86 und 100 % (25, 35, 47, 70, 75).
Für die Frühdiagnose invasiver Aspergillosen ist er damit nicht sensitiv genug (25, 35, 47, 70, 75).
Der Test zeigte einen positiven Vorhersagewert für das Vorliegen einer invasiven Aspergillusinfektion von 67 % (25) bzw. 100 % (47), einen negativen Vorhersagewert von 99 % (25) bzw. 84,9 % (47).
Des weiteren konnte eine Studie von Haynes und Rogers keine Korrelation der Ergebnisse des Latex-Tests aus Serumproben zu einer antimykotischen Therapie bzw. dem kulturellen Nachweis von Aspergillus Spezies finden (25).
Der Latex-Test kann somit auch nicht zur Therapiesteuerung einer antimykotischen Behandlung eingesetzt werden (35).

Vergleicht man nun den Latex-Agglutinationstest mit dem Galactomannan-ELISA (siehe unter 1.2.2.1. und 4.2.2.1.), so erhält man nachfolgende Ergebnisse: zum einen war der Galactomannan-ELISA früher im Verlauf einer Aspergillose in der Lage, Galactomannan nachzuweisen als der Latex-Agglutinationstest. Dieser lieferte positive Befunde eher in einem fortgeschrittenen Stadium der Infektion, d.h. bei höherer Antigenlast und ermöglichte daher keine Frühdiagnose. Zum anderen wird der Galactomannan-ELISA im Vergleich zum Latex-Test als sensitiver, aber weniger spezifisch beschrieben (47, 70, 75).

4.2.2.3 Der Nachweis von (1-3)-ß-D-Glucan

Zunächst sollte erwähnt werden, daß mittels dieser Methode keine Differenzierung auf Speziesebene vorgenommen werden kann.
Obayashi et al. fanden bei der Untersuchung klinischer Plasmaproben einen positiven Vorhersagewert von 59 % für das Vorliegen einer invasiven Pilzinfektion, der negative Vorhersagewert lag bei 97 %. Die Sensitivität wird in dieser Studie mit 90 %, die Spezifität mit 100 % angegeben (55).
Des weiteren wurde im Bezug auf den Test eine ausreichend hohe Sensitivität für den Nachweis von Candida und Aspergillus Spezies ermittelt, die Sensitivität für invasive Infektionen durch Cryptococcus Spezies ist indes unbefriedigend (53, 55).
Auch ist es nicht möglich, den Test bei Hämolyse-Patienten durchzuführen, vor allem dann, wenn bei der Hämolyse Cellulosemembranen verwendet werden. Diese Membranen kontaminieren das dialysierte Blut mit Glucan. Setzt man bei der Dialyse hingegen Triacetat-basierte Membranen ein, wurde dieses Problem nicht beobachtet (53, 55).
Yuasa et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, daß mit den Resultaten des (1-3)-β-D-Glucan-Nachweistests pulmonale Aspergillusinfektionen zuverlässig diagnostiziert werden können. Zusätzlich ist man mittels des quantitativen Glucannachweises in der Lage, eine Aussage darüber zu machen, in welchem Stadium der Infektion sich der Patient zum Zeitpunkt der Testung gerade befindet (86).
Betrachtet man die retrospektive Studie von Iwama et al. an 43 hämatologischen Patienten, so wird deutlich, daß eine erhebliche Senkung der Mortalitätsrate für Patienten mit Candidämie durch die Messung von (1-3)-β-D-Glucan im Plasma und eine darauf beruhende antimykotische Therapie möglich ist. Diese Therapie sollte indes zu einem frühen Zeitpunkt begonnen werden. Hierbei wurde eine frühe antimykotische Therapie derart beschrieben, daß der Therapiebeginn basierend auf den Ergebnissen des (1-3)-β-D-

Glucan-Tests vor oder innerhalb von 72 h nach der konventionellen Detektion von Pilzen in der Blutkultur lag (30).
Da diese Nachweismethode zahlenmäßig bislang nur sehr eingeschränkt auf Proben im klinischen Alltag angewandt wurde, ist es fraglich, ob der (1-3)-ß-D-Glucan-Test sicher und zuverlässig eine frühzeitige Diagnose einer systemischen Aspergillose erlaubt.

4.2.3 Molekularbiologische Nachweismethoden: PCR

Die Anwendung von PCR-basierten Nachweismethoden im klinischen Bereich ist bislang nur von wenigen Gruppen publiziert worden: Van Burik et al. fanden, daß bei drei Patienten mit detailliert beschriebener pulmonaler Aspergillose diese nicht als erstes mittels der PCR diagnostiziert worden war. Allerdings wurden hier die Patienten erst bei einem klinischen Verdacht auf eine invasive Pilzinfektion engmaschig mittels PCR untersucht. Die in dieser Studie eingesetzte Digoxigenin-markierte Oligonukleotidsonde erfaßte ein breites Spektrum verschiedener Pilz Spezies, ließ jedoch keine Unterscheidung auf Speziesebene zu (74).
Insgesamt fanden PCR-basierte Nachweismethoden erst bei wenigen klinischen Proben Anwendung (26, 29, 34, 63, 79); zudem wurden häufig Probenmaterialien eingesetzt, deren Gewinnung sehr aufwendig ist oder die keine engmaschige, prospektive Überwachung von Patienten erlauben (z.B. BAL-Proben) (8, 20, 29, 32, 50, 63, 67, 72). Außerdem nahmen bei einigen Studien lediglich Patienten teil, bei denen der Status bezüglich einer invasiven Aspergillusinfektion bereits vor der Testung feststand (74, 84, 85).
Hebart et al. untersuchten 84 Patienten nach allogener KMT mit der Fragestellung, inwieweit sich eine PCR zur frühen Diagnose einer invasiven Aspergillose eignet. Insgesamt zeigten 14,2 % aller Blutproben in der PCR ein positives Ergebnis, die Sensitivität der Methode wurde mit 100 % angegeben, die Spezifität mit 65 %. Darüber hinaus entwickelte keiner der Patienten mit negativem PCR-Resultat eine invasive Aspergillose während des Beobachtungszeitraumes. Hebart et al. fanden weiter, daß bei Patienten mit neu diagnostizierter invasiver Aspergillose ein positives PCR-Ergebnis den ersten klinischen Zeichen um durchschnittlich zwei Tage sowie der endgültigen klinischen Diagnose um durchschnittlich neun Tage vorausging. Die PCR wurde jedoch ebenfalls bei Patienten mit einer akuten GvHD, bei Patienten, die unter Cortisontherapie standen sowie bei Patienten, die eine invasive Aspergillose bereits vor KMT entwickelt

hatten, in signifikantem Maße positiv. Nach Meinung der Autoren kann die PCR als prospektive Screeningmethode dienen, um Patienten mit einem hohen Risiko für eine systemische Aspergillusinfektion zu überwachen (27).

In einer Arbeit von Lass-Florl et al. wurden Vollblutproben von 36 Patienten unter antimykotischer Therapie untersucht. Kann mittels PCR diesbezüglich eine invasive Aspergillusinfektion sicher und zuverlässig diagnostiziert werden? Die Ergebnisse der PCR wurden verglichen mit Ergebnissen von BAL- sowie Gewebsproben. Von den 36 Patienten hatten 15 Patienten eine gesicherte, neun Patienten eine wahrscheinliche und zwölf Patienten eine mögliche invasive Aspergillose. Bei den zuerst genannten Patienten konnten eine Sensitivität der PCR von 100 % bei BAL-Proben und 40 % bei Blutproben gefunden werden; der negative Vorhersagewert lag bei 44 %. Betrachtete man nun die Patienten mit wahrscheinlicher systemischer Aspergillusinfektion genauer, so zeigte sich eine Sensitivität von 66 % bei BAL-Proben und 44 % bei Blutproben. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Vorteil einer PCR-Diagnostik mittels Vollblutproben bei Patienten unter bereits begonnener antimykotischer Therapie gering ist; der alleinige Einsatz dieser diagnostischen Methode ist sicherlich nicht ausreichend (39).

Es ist zudem nicht vollkommen geklärt, welcher Stellenwert der PCR hinsichtlich des Nachweises von Aspergillus Spezies aus BAL-Proben eingeräumt werden kann und ob entsprechende Ergebnisse hier zur Diagnosestellung einer invasiven Aspergillose herangezogen werden können.

In den Studien von Tang et al. und Jones et al. wird eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 100 % bzw. 94,4 % für die Diagnose einer invasiven pulmonalen Aspergillusinfektion mittels PCR beschrieben. Untersucht wurden dabei BAL-Proben von immunsupprimierten Patienten (32, 72).

Dagegen sind bei der Verwendung von BAL-Proben falsch-positive Resultate beobachtet worden. So zeigten sich bei Spreadbury et al. bei 2 von 7 immunkompetenten und bei 2 von 10 immunsupprimierten Patienten positive Ergebnisse in der PCR (67). Des weiteren fanden Melchers et al. bei 3 von 8 neutropenen Patienten ein positives PCR-Resultat (50). Bei keinem dieser Patienten waren klinische Zeichen einer invasiven Aspergillose zu entdecken. Ebenso erkrankte bei Bretagne et al. keiner der 49 untersuchten Patienten an einer pulmonalen Aspergillusinfektion, obwohl 12 Patienten (25 %) ein positives PCR-Signal zeigten (8).

Demgegenüber beschreiben Einsele et al. eine signifikante Beziehung zwischen einer in der PCR positiv getesteten BAL-Probe und der Entwicklung einer invasiven pulmonalen Aspergillusinfektion nach KMT (19).
Die physische Belastung für den Patienten ist bei der Gewinnung von BAL-Proben relativ groß, Proben sind deshalb nur zu bestimmten Zeitpunkten zu erhalten. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von BAL-Proben besteht darin, daß eine BAL meist erst dann durchgeführt wird, wenn pulmonale Symptome oder Befunde in der Bildgebung beim Patienten zu erkennen sind. Diese Umstände machen eine frühzeitige Diagnose unmöglich. Damit ist Serum oder Blut als Probenmaterial für die ständige Patientenüberwachung besser geeignet.
In diesem Zusammenhang wurde von Yamakami et al. eine nested PCR zum Nachweis von Aspergillus Spezies im Serum eingesetzt. Es wurde ein Wert für die Sensitivität von 83 % gefunden. Yamakami et al. untersuchten 20 Patienten mit gesicherter invasiver Aspergillose und vermuteten weiterhin einen direkten Zusammenhang zwischen der Sensitivität der nested PCR und dem Grad der Aspergillusinfektion. Außerdem korrelierten die Ergebnisse der nested PCR nicht mit dem klinischen Verlauf unter antimykotischer Therapie (84).
Weiterhin beschrieben Sugita et al. eine PCR, die es ermöglicht, alle drei, im klinischen Alltag am häufigsten vorkommenden Aspergillus Spezies (Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger und Aspergillus flavus) nachzuweisen. Ausgangsmaterial waren hier Amplifikationsprodukte von insgesamt sieben verschiedenen Aspergillus Spezies, die als opportunistische Infektionserreger bekannt sind. Damit wäre man in der Lage, die Einleitung einer wirksamen und zielgerichteten antimykotischen Therapie deutlich zu beschleunigen. Zusätzlich könnte eine effektivere und sehr engmaschige Verlaufsbeobachtung einer schweren systemischen Aspergillusinfektion durchgeführt werden (69).

4.3 Charakteristika von NASBA

NASBA ist vom Grundprinzip her mit einer PCR vergleichbar, weist jedoch einige charakteristische Unterschiede auf. Diese Unterschiede bestehen auf seiten der PCR in sowohl einer aufwendigeren und kostenintensiveren Konstruktion als auch der größeren Menge des bereit zu stellenden Materials. Weiterhin ist die PCR mit deutlich höherem zeitlichen Aufwand verbunden und benötigt mehrmalige rasche Temperaturwechsel beim

Nachweis von RNA. NASBA besitzt außerdem eine zehnmal höhere Sensitivität verglichen mit der PCR. Die NASBA-Technologie ist darüber hinaus durch eine aktuelle Weiterentwicklung (NucliSens EasyQ, BioMerieux) in der Lage, die Amplifikations- und Detektionsschritte gleichzeitig auszuführen. Dadurch ergibt sich ein zusätzlicher Zeitgewinn. Insgesamt betrachtet ist NASBA eine Methode mit sowohl hoher Sensitivität als auch hoher Spezifität, als Probenmaterial können einfach zu gewinnende Vollblutproben verwendet werden. An die Methode wird außerdem der Anspruch gestellt, daß sie bei positivem Ergebnis eine invasive Erkrankung anzeigen soll, die in dieser Arbeit gefundenen Resultate sind diesbezüglich vielversprechend. Mit der hier eingesetzten NASBA-Technologie können zudem bei Verwendung entsprechender Oligonukleotidsonden auch andere humanpathogene Pilze, wie beispielsweise Candida Spezies, sowie verschiedene Bakterien und sogar Viren nachgewiesen werden; sie spielt damit bei der Diagnostik einiger weiterer im klinischen Alltag wichtiger Mikroorganismen eine Rolle. Aufgrund mehrerer Vorteile, wie beispielsweise die hohe Sensitivität und Spezifität, scheint die NASBA-Technologie eine geeignete Methode für eine frühe und exakte Diagnose verschiedenster Erkrankungen zu sein. Im folgenden werden nun die Einsatzmöglichkeiten von NASBA bei verschiedenen Mikroorganismen genauer betrachtet.

4.3.1 Einsatzmöglichkeiten bei anderen Pilz Spezies

Candida Spezies

Eine Studie von Widjojoatmodjo et al. untersuchte die Einsatzmöglichkeit der NASBA-Technologie im Hinblick auf klinisch relevante Candida Spezies und fand positive Resultate bei insgesamt sieben verschiedenen Spezies. Diese beinhalteten u.a. C. albicans, C. krusei und C. tropicalis. Des weiteren konnte eine reproduzierbar hohe Sensitivität der Methode festgestellt werden. In diesem Zusammenhang betonen die Autoren verschiedene positive Aspekte von NASBA, wie Schnelligkeit und Genauigkeit, weshalb sich das Verfahren ihrer Meinung nach für die Candida-Diagnostik besonders eignet (82).
Darüber hinaus testeten Loeffler et al. die NASBA-Methode an sechs verschiedenen Candida Spezies, darunter Candida glabrata, Candida krusei, Candida inconspicua, Candida dubliniensis, Candida norvegensis und Candida lusitaniae; zusätzlich verglichen die Autoren NASBA mit einer bereits etablierten PCR-Methode. Es zeigte sich eine Sensitivität von 1 CFU, außerdem war das NASBA-Verfahren in der Lage, RNA von

allen sechs Candida Spezies innerhalb eines Arbeitstages zu detektieren. Damit stellte sich auch in dieser Arbeit NASBA als eine ausreichend sensitive, spezifische und vor allem schnelle Methode heraus, wichtige Candida Spezies nachzuweisen (46).

4.3.2 Einsatzmöglichkeiten bei Viren

Zytomegalovirus (CMV)

Blok et al. verglichen in einer Studie mit 42 Patienten nach Nierentransplantation die NASBA-Technologie mit drei anderen diagnostischen Methoden im Hinblick auf die Entwicklung und die Überwachung einer Zytomegalovirus-Infektion. Es wurde eine höhere Sensitivität von NASBA (50 %) gegenüber dem immunzytochemischen Nachweis des pp65 Antigens (35 %) gefunden, die Sensitivitäten von NASBA und der eingesetzten Zellkultur waren vergleichbar (50 und 54 %, jeweils). NASBA zeigte den Beginn einer Infektion durch das Zytomegalovirus gleichzeitig mit der Zellkultur und der Methode durch Antigennachweis an. Sowohl der Antigennachweis als auch die NASBA-Technologie sind äußerst spezifisch (100 %) und haben einen sehr hohen Vorhersagewert (100 %) für den Beginn einer CMV-Infektion. Wurde eine antivirale Therapie mit Ganciclovir durchgeführt, so verblieben die Ergebnisse von NASBA, Antigennachweis und Zellkultur negativ (4).

In einer Arbeit von Hebart et al. wurden 33 Patienten nach allogener KMT mit einem hohen Risiko für eine CMV-Infektion bezüglich der Ergebnisse von NASBA, einer DNA-PCR aus Vollblutproben sowie verschiedenen Viruskulturen verglichen. Die unterschiedlichen Verfahren wurden einmal wöchentlich durchgeführt, und es zeigten sich auffällig hohe Übereinstimmungswerte bezüglich der NASBA- und PCR-Ergebnisse (85,3 % bei Betrachtung jeder einzelnen Probe, 87,9 % bei Betrachtung jedes einzelnen Patienten). Außerdem entwickelte im Studienverlauf keiner der NASBA-negativen Patienten eine CMV-Infektion. Darüber hinaus fanden die Autoren einen hohen positiven Vorhersagewert des NASBA-Verfahrens für die Wirksamkeit einer antiviralen Therapie. NASBA ist demnach in ausreichendem Maße im Rahmen eines Patienten-Screenings zur frühen Diagnose einer CMV-Infektion geeignet (28).

Human Immunodeficiency Virus (HIV)

Des weiteren testeten Shepard et al. die Möglichkeit, RNA von HIV-1 in verschiedenen Körperflüssigkeiten mittels NASBA quantitativ nachzuweisen. Als

Untersuchungsmaterial dienten Liquor, Speichel, Muttermilch, Samenflüssigkeit und Zervikalschleim. Beim Einsatz von Blutplasma gegenüber den einzelnen Körperflüssigkeiten von HIV-infizierten Patienten zeigte NASBA folgende Ergebnisse: 91 % waren Blutplasma-positiv und 55 % Zervikalschleim-positiv, 76 % waren Blutplasma-positiv und 46 % Speichel-positiv und 83 % waren Blutplasma-positiv und 63 % Samenflüssigkeit-positiv. Zusammenfassend konnte mit der NASBA-Technologie sehr gut RNA von HIV-1 in allen Körperflüssigkeiten quantitativ nachgewiesen werden; im Vergleich dazu wurde als diagnostische Methode eine RT-PCR verwendet. Diese wies beim Liquor und Zervikalschleim zwar eine höhere Sensitivität auf, ihr Nutzen wurde jedoch bei allen anderen Körperflüssigkeiten durch die Anwesenheit von Inhibitoren stark eingeschränkt (65).

Hepatitis C-Virus (HCV)

Auch bei der Hepatitis C kann die NASBA-Technologie eingesetzt werden. In einer Arbeit von Damen et al. zogen die Autoren zum Vergleich eine spezielle Methode zum Nachweis von HCV-DNA (bDNA, Chiron Corporation) und die HCV-MONITOR-Methode (Roche Diagnostic Systems) heran. Sie fanden bei NASBA eine mehr als zehnmal höhere Sensitivität gegenüber der bDNA-Methode, während sich die quantitativen Ergebnisse stark ähnelten. NASBA war bezüglich der Sensitivität vergleichbar mit der HCV-MONITOR-Methode, wobei die HCV-MONITOR-Methode permanent niedrigere Werte lieferte. Zusammenfassend läßt sich die NASBA-Technologie im Bereich der HCV-Infektionen als verläßliche Nachweismethode von HCV-RNA unter unterschiedlichen Bedingungen beschreiben (12).

West Nile virus

Lanciotti et al. verglichen hierzu die NASBA-Technologie mit einer TaqMan RT-PCR und konnten eine außergewöhnlich hohe Sensitivität und Spezifität der NASBA-Methode nachweisen. Ein weiterer Vorteil bestand in einer sehr schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse bei NASBA (< 1 h). Insgesamt kamen die Autoren zu dem Schluß, der NASBA-Technologie einen hohen Stellenwert im Rahmen der Diagnostik von Flaviviren einzuräumen (38).

Influenza A

Die Entwicklung und Einführung einer wirksamen Behandlungsmöglichkeit einer Infektion mit dem Influenza A-Virus durch Neuraminidase-Inhibitoren haben die Notwendigkeit einer schnellen Diagnose einer solchen Infektion mit sich gebracht. Dies gilt vor allem für Bevölkerungsteile mit diesbezüglich erhöhtem Risiko. Moore et al. testeten die NASBA-Methode an einer großen Zahl von Influenza A-Subtypen und konnten sehr hohe Werte sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität nachweisen. Es wurden insgesamt 389 klinische Proben untersucht. NASBA detektierte dabei 64 % mehr Influenza A-positive Proben im Vergleich zu Zellkulturen sowie dem direkten Immunfluoreszenztest (IF). Daraus folgernd kann der NASBA-Methode eine höhere Sensitivität beim Nachweis von Influenza A verglichen mit herkömmlichen Verfahren bescheinigt werden (54).

4.3.3 Einsatzmöglichkeiten bei Bakterien

Salmonella enterica

Simpkins et al. überprüften die Einsatzmöglichkeit von NASBA bei diesem bakteriellen Erreger einer Gastroenteritis und zeigten hier eine überaus hohe Effektivität der NASBA-Technologie. Darüber hinaus konnte dargestellt werden, daß eventuell vorhandene DNA keinen Einfluß auf das Verfahren ausübt. RNase-behandelte Extrakte ergaben bei der Amplifikation durch NASBA trotz eines hohen Gehalts an DNA kein Signal; der DNA-Gehalt wurde durch ein starkes PCR-Signal nachgewiesen. Außerdem unterschieden sich die Ergebnisse von lebenden und pasteurisierten Proben erheblich, obwohl die Menge an DNA in beiden Fällen die gleiche war (66).

Bacillus anthracis

Auch bei diesem, in letzter Zeit sehr viel beachteten Erreger kann NASBA dazu eingesetzt werden, in Zellen vorhandene RNA nachzuweisen. Baeumner et al. konnten mit Hilfe eines speziellen Biosensors eine untere Nachweisgrenze von 1 fmol Ziel-RNA bestimmen. Des weiteren zeigte sich eine hohe Spezifität, Kreuzreaktionen mit elf weiteren Spezies, darunter nah verwandte Spezies wie Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis und Bacillus thuringiensis ergaben sich nicht. Außerdem fanden sich keine falsch-positiven Ergebnisse bei nicht lebensfähigen Bacillus anthracis-Sporen (2).

4.4 Kontaminationen

Da sich RNA generell als sehr beständig erweist, müssen beim Arbeiten hiermit sehr genaue und detaillierte Vorschriften zur Vermeidung von Kontaminationen und der damit verbundenen Gefährdung der gesamten Testergebnisse beachtet werden: Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte in getrennten Räumen, Einsatz der Arbeitsmaterialien und –geräte ausschließlich für NASBA, Tragen von entsprechender Schutzkleidung, etc.
In jedem Lauf von NASBA, der zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen führte, wurden Negativkontrollen mitanalysiert; diese waren durchweg negativ. Somit konnte eine Kontamination des gesamten Systems ausgeschlossen werden.
Es sollte jedoch erwähnt werden, daß es im späteren Verlauf der experimentellen Durchführung der Arbeit trotz genauester Beachtung der oben beschriebenen Vorschriften immer wieder zu Kontaminationen sowohl einzelner Proben als auch kompletter NASBA-Läufe kam. Dabei konnte der Ursprung der Kontaminationen nicht geklärt werden, möglicherweise waren Arbeitsgeräte bzw. –materialien oder Bestandteile des RNeasy Minikits (Qiagen, Hilden, Deutschland) bzw. des NucliSens Basic Kits (Organon Teknika, Boxtel, Niederlande) verunreinigt.
Insgesamt wird die Robustheit des NASBA-Verfahrens durch die nicht zu unterschätzende Gefahr von Kontaminationen sowie den notwendigen Aufwand zur Vermeidung solcher Kontaminationen doch in gewissem Maße eingeschränkt; hier sind weitere Studien zur genaueren Untersuchung dieser Sachverhalte anzustreben.

4.5 NASBA als Bestandteil neuer Behandlungsstrategien systemischer Aspergillosen

Zunächst ist es wichtig zu erwähnen, daß die Mortalität einer systemischen Aspergillusinfektion bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien bzw. nach allogener KMT sehr hoch ist.
Das bisherige Behandlungskonzept solcher Infektionen bleibt trotz vielversprechender Neuerungen auf dem pharmazeutischen Sektor aus verschiedenen Gründen unbefriedigend. Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen und antibiotikaresistentem Fieber nach allogener KMT werden empirisch antimykotische Medikamente verabreicht. Da dem Fieber natürlich nicht in jedem Falle eine Aspergillose zugrunde liegt, nimmt man hier eine Übertherapie in Kauf; zudem sind die Ansprechraten

von Itraconazol und Amphotericin B niedrig (13, 14, 15). Des weiteren besitzt Amphotericin B eine deutliche Toxizität (40), welche durch die Weiterentwicklung hin zur liposomalen Zubereitungsform (AmBisome) stark vermindert werden konnte (52, 58, 59, 80). Nachteilig wirken diesbezüglich der hohe Preis von AmBisome sowie die Tatsache, daß auch unter Therapie mit diesem Medikament systemische Aspergillusinfektionen beobachtet wurden (40, 81). Eine Studie wies für Amphotericin B eine Senkung der Mortalität bei Gabe als Einzeltherapeutikum nach, eine prophylaktische oder empirische Behandlung mit Antimykotika insgesamt ergab keine Änderung der Mortalität (23).

Andere Behandlungsmöglichkeiten, sei es auf chirurgischem Gebiet oder im Bereich der Zell- und Zytokintherapie, sind nur bei wenigen ausgesuchten Patienten bzw. als adjuvante Therapien einsetzbar (15, 40).

In jedem Falle ist eine möglichst frühzeitige Einleitung einer medikamentösen Therapie mit AmBisome oder konventionellem Amphotericin B zur Verbesserung der Prognose invasiver Aspergillosen anzustreben (1, 10, 77). In diesem Zusammenhang bietet die NASBA-Technologie als sehr sensitive Nachweismethode mit schneller Verfügbarkeit der Ergebnisse eine vielversprechende Möglichkeit, bestehende Therapiekonzepte zu verbessern bzw. zu erweitern oder neue Behandlungsstrategien aufzuzeigen.

5. Zusammenfassung

Systemische Pilzinfektionen sind durch ihre stetige Zunahme in den letzten Jahren immer stärker ins Blickfeld gerückt; invasive Mykosen werden in diesem Zusammenhang in immer größerem Ausmaß von Aspergillus Spezies verursacht. Die Mortalität invasiver Aspergillosen ist außerordentlich hoch. Mittels dieser Arbeit sollte daher die Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)-Technologie auf ihre Sensitivität, Spezifität und Robustheit beim Nachweis von Aspergillus Spezies hin untersucht werden. Außerdem wurden die Ergebnisse mit denen einer bereits etablierten Aspergillus-PCR verglichen. Ein weiteres Ziel war, eine erste Aussage bezüglich der klinischen Anwendbarkeit der Methode machen zu können.

Als untere Nachweisgrenze für RNA aus Aspergillus Spezies konnte 1 CFU pro ml Blut gefunden werden, die NASBA-Sonde detektierte dabei zuverlässig RNA von Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus versicolor, Aspergillus glaucus und Aspergillus niger. Darüber hinaus zeigten sich Kreuzreaktionen der Sonde lediglich mit RNA von Penicillium brevicompactum, Penicillium chrysogenum und Alternaria alternata; Testreihen mit RNA von sechs weiteren Pilz Spezies, darunter Candida albicans, von Zytomegalovirus sowie von menschlichen Fibroblasten verblieben negativ. Damit werden mithilfe des NASBA-Verfahrens alle klinisch relevanten Aspergillus Spezies amplifiziert und detektiert.

Weiterhin zeichnet sich die NASBA-Technologie durch einen hohen Grad an Robustheit aus, da in jedem von 28 Läufen mit einer bestimmten Zahl an Aspergillus-Konidien (10^6 bis 10^0 CFU) RNA detektiert werden konnte.

Liegt eine Koinfektion mit zwei oder mehr unterschiedlichen Pilz Spezies vor, so erwiesen sich die Sensitivität sowie die Spezifität der Methode als unverändert.

Zusätzlich stellte sich der Einsatz eines RNA-Schutzpuffers (RNA Secure) als wichtiges Hilfsmittel innerhalb des NASBA-Verfahrens heraus, um eine rasche Degradation im Probenmaterial zu verhindern.

Im Vergleich zur PCR können einige Vorteile von NASBA beschrieben werden. Die NASBA-Technologie ist deutlich weniger fehleranfällig und benötigt einen geringeren zeitlichen Aufwand; ein Lauf kann bei NASBA innerhalb eines Arbeitstages durchgeführt werden. Darüber hinaus besitzt NASBA eine zehnmal höhere Sensitivität. Der Amplifikationsschritt wird auf einer gleichbleibenden Temperaturstufe ausgeführt, die

PCR benötigt diesbezüglich mehrmalige rasche Temperaturwechsel. Des weiteren kann bei NASBA eine weitaus geringere Menge an Probenmaterial verwendet werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, daß die NASBA-Technologie in vielen Bereichen, sei es die Detektion von Pilzen, Viren oder Bakterien, erfolgversprechende Ergebnisse für viele klinische Anwendungsgebiete zeigt. Die Schnelligkeit, die hohe Sensitivität und Spezifität der Methode sowie der geringe Aufwand bei der Probengewinnung und die Zuverlässigkeit sind wichtige Punkte im Hinblick auf zukünftige Einsatzmöglichkeiten. Es besteht die Aussicht, dieses Verfahren in vielen Gebieten der Diagnostik einsetzen zu können. Allerdings ist NASBA häufig noch vollkommen unbekannt oder wird zumindest in der täglichen Routine nicht eingesetzt. Eine weitere intensive Forschung ist diesbezüglich sicherlich lohnenswert; hierdurch könnte diese Methode noch mehr Beachtung finden.

Eine Arbeit zur Etablierung und Evaluierung von NASBA zum Nachweis von Pilz-RNA im Blut von immunsupprimierten Patienten wurde bereits durchgeführt.

6. Literaturverzeichnis

1 Aisner J., Schimpff S.C., Wiernik P.H. (1977):
„Treatment of invasive aspergillosis: relation of early diagnosis and treatment to response“
Ann. Intern. Med., 86, 539-543

2 Baeumner A.J., Leonard B., McElwee J., Montagna R.A. (2004):
„A rapid biosensor for viable B. anthracis spores“
Anal. Bioanal. Chem., 380, 15-23

3 Baron O., Guillaume B., Moreau P., Germaud P., Despins P., De Lajartre A.Y., Michaud J.L. (1998):
„Aggressive surgical management in localized pulmonary mycotic and nonmycotic infections for neutropenic patients with acute leukemia: report of eighteen cases“
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 115, 63-69

4 Blok M.J., Goossens V.J., Vanherle S.J.V., Top B., Tacken N., Middeldorp J.M., Christiaans M.H.L., Van Hooff J.P., Bruggeman C.A. (1998):
„Diagnostic Value of Monitoring Human Cytomegalovirus Late pp67 mRNA Expression in Renal-Allograft Recipients by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification“
J. Clin. Microbiol., 36, 1341-1346

5 Bodey G.P., Vartivarian S. (1989):
„Aspergillosis“
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 8, 413-437

6 Bodey G.P., Bueltmann B., Duguid W., Gibbs D., Hanak H., Hotchi M., Mall G., Martino P., Meunier F., Milliken S., Naoe S., Okudaira M., Scevola D., van't Wout J. (1992):
„Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey“
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11, 99-109

7 Boogaerts M., Winston D.J., Bow E.J., Garber G., Reboli A.C., Schwarer A.P., Novitzky N., Boehme A., Chwetzoff E., De Beule K. (2001):
„Intravenous and oral itraconazole versus intravenous amphotericin B deoxycholate as empirical antifungal therapy for persistent fever in neutropenic patients with cancer who are receiving broad-spectrum antibacterial therapy. A randomized, controlled trial“
Ann. Intern. Med., 135, 412-422

8 Bretagne S., Costa J.-M., Marmorat-Khuong A., Poron F., Cordonnier C., Vidaud M., Fleury-Feith J. (1995):
„Detection of Aspergillus species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR“
J. Clin. Microbiol., 33, 1164-1168

9 Bretagne S., Marmorat-Khuong A., Kuentz M., Latgé J.-P., Bart-Delabesse E., Cordonnier C. (1997):
„Serum Aspergillus galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: practical use in neutropenic patients“
J. Infect., 35, 7-15

10 Caillot D., Casasnovas O., Bernard A., Couaillier J.-F., Durand C., Cuisenier B., Solary E., Piard F., Petrella T., Bonnin A., Couillault G., Dumas M., Guy H. (1997):
„Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery“
J. Clin. Oncol., 15, 139-147

11 Compton J. (1991):
„Nucleic acid sequence-based amplification“
Nature, 350, 91-92

12 Damen M., Sillekens P., Cuypers H.T.M., Frantzen I., Melsert R. (1999):
„Characterization of the quantitative HCV NASBA assay“
J. Virol. Methods, 82, 45-54

13 Denning D.W., Stevens D.A. (1990):
„Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2,121 published cases“
Rev. Infect. Dis., 12, 1147-1201

14 Denning D.W. (1996):
„Therapeutic outcome in invasive aspergillosis“
Clin. Infect. Dis., 23, 608-615

15 Denning D.W. (1998):
„Invasive aspergillosis“
Clin. Infect. Dis., 26, 781-805

16 De Pauw B.E. (1997):
„Practical modalities for prevention of fungal infections in cancer patients“
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 16, 32-41

17 Donnelly J.P. (1997):
„Is there a rationale for the use of antimicrobial prophylaxis in neutropenic patients?“
J. Intern. Med., 242 Suppl. 740, 79-88

18 Dupont B. (2002):
„Overview of the lipid formulations of amphotericin B“
J. Antimicrob. Chemother., 49 Suppl. S1, 31-36

19 Einsele H., Quabeck K., Müller K.-D., Hebart H., Rothenhöfer I., Loeffler J., Schaefer U.W. (1998):
„Prediction of invasive pulmonary aspergillosis from colonisation of lower respiratory tract before marrow transplantation“
Lancet, 352, 1443

20 Fletcher H.A., Barton R.C., Verweij P.E., Evans E.G.V. (1998):
„Detection of Aspergillus fumigatus PCR products by a microtitre plate based DNA hybridization assay“
J. Clin. Pathol., 51, 617-620

21 Garber G. (2001):
„An Overview of Fungal Infections“
Drugs, 61 Suppl. 1, 1-12

22 Glasmacher A., Just-Nübling G., Molitor E. (1998):
„Therapie invasiver Mykosen bei neutropenischen Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen“
Dtsch. med. Wschr., 123, 191-194

23 Gøtzsche P.C., Johansen H.K. (1997):
„Meta-analysis of prophylactic or empirical antifungal treatment versus placebo or no treatment in patients with cancer complicated by neutropenia“
BMJ, 314, 1238-1244

24 Groll A.H., Shah P.M., Mentzel C., Schneider M., Just-Nübling G., Hübner K. (1996):
„Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital“
J. Infect., 33, 23-32

25 Haynes K., Rogers T.R. (1994):
„Retrospective evaluation of a latex agglutination test for diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients“
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13, 670-674

26 Haynes K.A., Westerneng T.J., Fell J.W., Moens W. (1995):
„Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA“
J. Med. Vet. Mycol., 33, 319-325

27 Hebart H., Loeffler J., Meisner C., Serey F., Schmidt D., Bohme A., Martin H., Engel A., Bunje D., Kern W.V., Schumacher U., Kanz L., Einsele H. (2000):
„Early detection of aspergillus infection after allogenic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening“
J. Infect. Dis., 181, 1713-1719

28 Hebart H., Rudolph T., Loeffler J., Middeldorp J., Ljubicic T., Jahn G., Einsele H. (2002):
„Evaluation of the NucliSens CMV pp67 assay for detection and monitoring of human cytomegalovirus infection after allogenic stem cell transplantation“
Bone Marrow Transplant., 30, 181-187

29 Hopfer R.L., Walden P., Setterquist S., Highsmith W.E. (1993):
„Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis“
J. Med. Vet. Mycol., 31, 65-75

30 Iwama A., Yoshida M., Miwa A., Obayashi T., Sakamoto S., Miura Y. (1993):
„Improved survival from fungemia in patients with haematological malignancies: analysis of risk factors for death and usefulness of early antifungal therapy“
Eur. J. Haematol., 51, 156-160

31 Jantunen E., Ruutu P., Niskanen L., Volin L., Parkkali T., Koukila-Kähkölä P., Ruutu T. (1997):
„Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogenic BMT recipients“
Bone Marrow Transplant., 19, 801-808

32 Jones M.E., Fox A.J., Barnes A.J., Oppenheim B.A., Balagopal P., Morgenstern G.R., Scarffe J.H. (1998):
„PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis infection in neutropenic patients“
J. Clin. Pathol., 51, 652-656

33 Kami M., Machida U., Okuzumi K., Matsumura T., Mori Si S., Hori A., Kashima T., Kanda Y., Takaue Y., Sakamaki H., Hirai H., Yoneyama A., Mutou Y. (2002):
„Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with haematological malignancy“
Br. J. Haematol., 117, 40-46

34 Kappe R., Fauser C., Okeke C.N., Maiwald M. (1996):
„Universal fungus-specific primer systems and group-specific hybridization oligonucleotides for 18S rDNA“
Mycoses, 39, 25-30

35 Kappe R., Schulze-Berge A., Sonntag H.-G. (1996):
„Evaluation of eight antibody tests and one antigen test for the diagnosis of invasive aspergillosis“
Mycoses, 39, 13-23

36 Karp J.E., Burch P.A., Merz W.G. (1988):
„An approach to intensive antileukemia therapy in patients with previous invasive aspergillosis“
Am. J. Med., 85, 203-206

37 Kelsey S.M., Goldman J.M., McCann S., Newland A.C., Scarffe J.H., Oppenheim B.A., Mufti G.J. (1999):
„Liposomal amphotericin (AmBisome) in the prophylaxis of fungal infections in neutropenic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled study“
Bone Marrow Transplant., 23, 163-168

38 Lanciotti R.S., Kerst A.J. (2001):
„Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St.Louis encephalitis viruses“
J. Clin. Microbiol., 39, 4506-4513

39 Lass-Florl C., Gunsilius E., Gastl G., Bonatti H., Freund M.C., Gschwendtner A., Kropshofer G., Dierich M.P., Petzer A. (2004):
„Diagnosing invasive aspergillosis during antifungal therapy by PCR analysis of blood samples“
J. Clin. Microbiol., 42, 4154-4157

40 Latgé J.-P. (1999):
„Aspergillus fumigatus and aspergillosis“
Clin. Microbiol. Rev., 12, 310-350

41 Laverdiere M., Hoban D., Restieri C., Habel F. (2002):
„In vitro activity of three new triazoles and one echinocandin against Candida bloodstream isolates from cancer patients“
J. Antimicrob. Chemother., 50, 119-123

42 Leenders A.C.A.P., de Marie S. (1996):
„The use of lipid formulations of amphotericin B for systemic fungal infections“
Leukemia, 10, 1570-1575

43 Loeffler J., Hebart H., Sepe S., Schumacher U., Klingebiel T., Einsele H. (1998):
„Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system“
Med. Mycol., 36, 275-279

44 Loeffler J., Hebart H., Cox P., Flues N., Schumacher U., Einsele H. (2001):
„Nucleic acid sequence-based amplification of Aspergillus RNA in blood samples“
J. Clin. Microbiol., 39, 1626-1629

45 Loeffler J., Schmidt K., Hebart H., Schumacher U., Einsele H. (2002):
„Automated Extraction of Genomic DNA from medically important Yeast Species and Filamentous Fungi by using the MagNA Pure LC System“
J. Clin. Microbiol., 40, 2240-2243

46 Loeffler J., Dorn C., Hebart H., Cox P., Magga S., Einsele H. (2003):
„Development and evaluation of the nuclisens basic kit NASBA for the detection of RNA from Candida species frequently resistant to antifungal drugs“
Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 45, 217-220

47 Machetti M., Feasi M., Mordini N., Van Lint M.T., Bacigalupo A., Latgé J.-P., Sarfati J., Viscoli C. (1998):
„Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients“
Bone Marrow Transplant., 21, 917-921

48 Malik I.A., Moid I., Aziz Z., Khan S., Suleman M. (1998):
„A randomized comparison of fluconazole with amphotericin B as empiric anti-fungal agents in cancer patients with prolonged fever and neutropenia“
Am. J. Med., 105, 478-483

49 Mallet F., Oriol G., Mary C., Verrier B., Mandrand B. (1995):
„Continuous RT-PCR using AMV-RT and Taq DNA polymerase: characterization and comparison to uncoupled procedures“
Biotechniques., 18, 678-687

50 Melchers W.J.G., Verweij P.E., van den Hurk P., van Belkum A., De Pauw B.E., Hoogkamp-Korstanje J.A.A., Meis J.F.G.M. (1994):
„General primer-mediated PCR for detection of Aspergillus species“
J. Clin. Microbiol., 32, 1710-1717

51 Meyers J.D. (1990):
„Fungal infections in bone marrow transplant patients“
Semin. Oncol., 17 Suppl. 6, 10-13

52 Mills W., Chopra R., Linch D.C., Goldstone A.H. (1994):
„Liposomal amphotericin B in the treatment of fungal infections in neutropenic patients: a single-centre experience of 133 episodes in 116 patients“
Brit. J. Haematol., 86, 754-760

53 Miyazaki T., Kohno S., Mitsutake K., Maesaki S., Tanaka K.-I., Ishikawa N., Hara K. (1995):
„Plasma (1-3)-ß-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and crytococcosis“
J. Clin. Microbiol., 33, 3115-3118

54 Moore C., Hibbitts S., Owen N., Corden S.A., Harrison G., Fox J., Gelder C., Westmoreland D. (2004):
„Development and evaluation of a real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for rapid detection of influenza A“
J. Med. Virol., 74, 619-628

55 Obayashi T., Yoshida M., Mori T., Goto H., Yasuoka A., Iwasaki H., Teshima H., Kohno S., Horiuchi A., Ito A., Yamaguchi H., Shimada K., Kawai T. (1995):
„Plasma (1-3)-ß-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes“
Lancet, 345, 17-20

56 Offner F., Cordonnier C., Ljungman P., Prentice H.G., Engelhard D., De Bacquer D., Meunier F., De Pauw B. (1998):
„Impact of previous aspergillosis on the outcome of bone marrow transplantation“
Clin. Infect. Dis., 26, 1098-1103

57 Pfaller M.A., Messer S.A., Hollis R.J., Jones R.N. (2001):
„In vitro activities of posaconazole (Sch 56592) compared with those of itraconazole and fluconazole against 3,685 clinical isolates of Candida spp. and Cryptococcus neoformans“
Antimicrob. Agents Chemother., 45, 2862-2864

58 Prentice H.G., Hann I.M., Herbrecht R., Aoun M., Kvaloy S., Catovsky D., Pinkerton C.R., Schey S.A., Jacobs F., Oakhill A., Stevens R.F., Darbyshire P.J., Gibson B.E.S. (1997):
„A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients“
Brit. J. Haematol., 98, 711-718

59 Ringdén O., Meunier F., Tollemar J., Ricci P., Tura S., Kuse E., Viviani M.A., Gorin N.C., Kastersky J., Fenaux P., Prentice H.G., Ksionski G. (1991):
„Efficacy of amphotericin B encapsulated in liposomes (AmBisome) in the treatment of invasive fungal infections in immunocompromised patients“
J. Antimicrob. Chemother., 28 Suppl. B, 73-82

60 Rohner P., Pepey B., Auckenthaler R. (1994):
„Comparison of BacT/Alert with Signal Blood Culture System“
J. Clin. Microbiol., 33, 313-317

61 Rohrlich P., Sarfati J., Mariani P., Duval M., Carol A., Saint-Martin C., Bingen E., Latgé J.-P., Vilmer E. (1996):
„Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis“
Pediatr. Infect. Dis. J., 15, 232-237

62 Salerno C.T., Ouyang D.W., Pederson T.S., Larson D.M., Shake J.P., Johnson E.M., Maddaus M.A. (1998):
„Surgical therapy for pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients“
Ann. Thorac. Surg., 65, 1415-1419

63 Sandhu G.S., Kline B.C., Stockman L., Roberts G.D. (1995):
„Molecular probes for diagnosis of fungal infections“
J. Clin. Microbiol., 33, 2913-2919

64 Saugier-Veber P., Devergie A., Sulahian A., Ribaud P., Traore F., Bourdeau-Esperou H., Gluckman E., Derouin F. (1993):
„Epidemiology and diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in bone marrow transplant patients: results of a 5 year retrospective study“
Bone Marrow Transplant., 12, 121-124

65 Shepard R.N., Schock J., Robertson K., Shugars D.C., Dyer J., Vernazza P., Hall C., Cohen M.S., Fiscus S.A. (2000):
„Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Different Biological Compartments“
J. Clin. Microbiol., 38, 1414-1418

66 Simpkins S.A., Chan A.B., Hays J., Pöpping B., Cook N. (1999):
„An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable Salmonella enterica“
Letters Appl. Microbiol., 30, 75-79

67 Spreadbury C., Holden D., Aufauvre-Brown A., Bainbridge B., Cohen J. (1993):
„Detection of Aspergillus fumigatus by polymerase chain reaction“
J. Clin. Microbiol., 31, 615-621

68 Stynen D., Goris A., Sarfati J., Latgé J.-P. (1995):
„A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis“
J. Clin. Microbiol., 33, 497-500

69 Sugita C., Makimura K., Uchida K., Yamaguchi H., Nagai A. (2004):
„PCR identification system for the genus Aspergillus and three major pathogenic species: Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, and Aspergillus niger“
Med. Mycol., 42, 433-437

70 Sulahian A., Tabouret M., Ribaud P., Sarfati J., Gluckman E., Latgé J.-P., Derouin F. (1996):
„Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis“
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 15, 139-145

71 Swanink C.M.A., Meis J.F.G.M., Rijs A.J.M.M., Donnelly J.P., Verweij P.E. (1997):
„Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Aspergillus galactomannan“
J. Clin. Microbiol., 35, 257-260

72 Tang C.M., Holden D.W., Aufauvre-Brown A., Cohen J. (1993):
„The detection of Aspergillus spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid“
Am. Rev. Respir. Dis., 148, 1313-1317

73 Tollemar J., Ringdén O., Andersson S., Sundberg B., Ljungman P., Tyden G. (1993):
„Randomized double-blind study of liposomal amphotericin B (AmBisome) prophylaxis of invasive fungal infections in bone marrow transplant recipients“
Bone Marrow Transplant., 12, 577-582

74 Van Burik J.-A., Myerson D., Schreckhise R.W., Bowden R.A. (1998):
„Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens“
J. Clin. Microbiol., 36, 1169-1175

75 Verweij P.E., Stynen D., Rijs A.J.M.M., De Pauw B.E., Hoogkamp-Korstanje J.A.A., Meis J.F.G.M. (1995):
„Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients“
J. Clin. Microbiol., 33, 1912-1914

76 Verweij P.E., Erjavec Z., Sluiters W., Goessens W., Rozenberg-Arska M., Debets-Ossenkopp Y.J., Guiot H.F.L., Meis J.F.G.M. (1998):
„Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra- and interlaboratory reproducibility“
J. Clin. Microbiol., 36, 1612-1616

77 Von Eiff M., Roos N., Schulten R., Hesse M., Zühlsdorf M., van de Loo J. (1995):
„Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival“
Respiration, 62, 341-347

78 Wald A., Leisenring W., van Burik J.-A., Bowden R.A. (1997):
„Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation“
J. Infect. Dis., 175, 1459-1466

79 Walsh T.J., Francesconi A., Kasai M., Chanock S.J. (1995):
„PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi“
J. Clin. Microbiol., 33, 3216-3220

80 Walsh T.J., Pappas P., Winston D.J., Lazarus H.M., Petersen F., Raffalli J., Yanovich S., Stiff P., Greenberg R., Donowitz G., Lee J. (2002):
„Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever“
N. Engl. J. Med., 346, 225-234

81 Warnock D.W. (1995):
„Fungal complications of transplantation: diagnosis, treatment and prevention“
J. Antimicrob. Chemother., 36 Suppl. B, 73-90

82 Widjojoatmodjo M.N., Borst A., Schukkink R.A., Box A.T., Tacken N.M., Van Gemen B., Verhoef J., Top B., Fluit A.C. (1999):
„Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection of medically important Candida species“
J. Microbiol. Methods, 38, 81-90

83 Winston D.J., Hathorn J.W., Schuster M.G., Schiller G.J., Territo M.C. (2000):
„A multicenter, randomized trial of fluconazole versus amphotericin B for empiric antifungal therapy of febrile neutropenic patients with cancer“
Am. J. Med., 108, 282-289

84 Yamakami Y., Hashimoto A., Tokimatsu I., Nasu M. (1996):
„PCR detection of DNA specific for Aspergillus species in serum of patients with invasive aspergillosis“
J. Clin. Microbiol., 34, 2464-2468

85 Yamakami Y., Hashimoto A., Yamagata E., Kamberi P., Karashima R., Nagai H., Nasu M. (1998):
„Evaluation of PCR for detection of DNA specific for Aspergillus species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis“
J. Clin. Microbiol., 36, 3619-3623

86 Yuasa K., Goto H., Iguchi M., Okamura T., Ieki R. (1996):
„Evaluation of the diagnostic value of the measurement of (1-3)-ß-D-glucan in patients with pulmonary aspergillosis“
Respiration, 63, 78-83

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Loeffler J., Hebart H., Cox P., Flues N., Schumacher U., Einsele H. (2001)
Nucleic acid sequence based amplification of Aspergillus RNA in blood samples
J. Clin. Microbiol. 39 (4), 1626-1629

Lebenslauf

11. April 1974	geboren in Tübingen
1980-1984	Grundschule in Tübingen
1984-1993	Kepler-Gymnasium in Tübingen
Mai 1993	Abitur
1993-1994	Zivildienst am Universitätsklinikum in Tübingen
Oktober 1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
August 1996	Ärztliche Vorprüfung an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
März 1998	1. Abschnitt der ärztlichen Staatsprüfung an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
September 1999	2. Abschnitt der ärztlichen Staatsprüfung an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
Oktober 1999	Beginn der Promotion in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
2001-2002	Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Reutlingen
15.05.2002	3. Abschnitt der ärztlichen Staatsprüfung an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
2003-2004	Arzt im Praktikum am Kreiskrankenhaus Rottweil
Seit 15.07.2004	Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Rottweil