

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Evaluierung des SeptiFast – Testsystems bei hämatologischen Patienten nach
Stammzelltransplantation/ Knochenmarktransplantation im Vergleich zur
Blutkultur und einem alternativen PCR-System**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sandra Elges
aus Lüdenscheid

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Zusammenfassung/ Abstract.....	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract.....	2
2 Einleitung.....	4
2.1 Allogene Stammzelltransplantation.....	4
2.1.1 Epidemiologie und Indikationen	4
2.1.2 Prinzip der allo-SZT.....	5
2.1.3 Infektionen nach allo-SZT.....	7
2.2 Mikrobiologische Diagnostik bakterieller und fungaler Infektionen.....	9
2.2.1 Blutkulturen.....	9
2.2.2 Polymerasekettenreaktion	10
2.2.2.1 Grundprinzip des PCR-Zyklus	10
2.2.2.2 Grundprinzip der „Real-Time“ PCR.....	11
2.2.2.3 PCR in der Erregerdiagnostik.....	14
2.2.2.4 LightCycler® SeptiFast Test.....	15
2.3 Zielsetzung	17
3 Material.....	18
4 Patientenmanagement.....	22
4.1 Patientenrekrutierung.....	22
4.2 Antimikrobielle Prophylaxe	22
4.3 Konditionierung vor allo-SZT	22
4.4 Probengewinnung	23
5 Methoden	24
5.1 Mikrobiologischer Erregernachweis.....	24
5.1.1 Blutkulturen.....	24
5.1.2 LightCycler® SeptiFast Test.....	24
5.1.2.1 Extraktion bakterieller und fungaler DNS aus EDTA-Blut.....	25
5.1.2.2 Amplifikation und Detektion mittels Multiplex „Real-Time“ PCR.....	26
5.1.2.3 Automatische Erreger-Identifikation.....	30

5.1.3	Inhouse-Methode	30
5.1.3.1	Extraktion fungaler DNS aus EDTA-Blut.....	30
5.1.3.2	„Real-Time“ PCR nach Schabereiter-Gurtner et al.	32
5.2	Grundlegende Definitionen verwendeter Begriffe und Kriterien.....	34
5.2.1	Fieber unklarer Ursache bei Patienten mit Granulozytopenie	34
5.2.2	Sepsis	34
5.2.3	EORTC-MSG-Kriterien	35
5.3	Statistische Auswertung	36
6	Ergebnisse.....	38
6.1	Patientenkollektiv	38
6.2	Ergebnisse der mikrobiologischen Diagnostik.....	39
6.2.1	Blutkulturen.....	39
6.2.1.1	Ergebnisse der Blutkulturen.....	39
6.2.1.2	Nachgewiesene Erreger.....	40
6.2.2	LightCycler® SeptiFast Test	41
6.2.2.1	Ergebnisse des LightCycler® SeptiFast Tests (SF-Test)	41
6.2.2.2	Nachgewiesene Erreger bei Fieber	43
6.2.2.3	Nachgewiesene Erreger während des Monitoring.....	44
6.2.3	Inhouse-Methode	46
6.2.3.1	Ergebnisse der Inhouse-Methode	46
6.2.3.2	Nachgewiesene Erreger bei Fieber	46
6.2.3.3	Nachgewiesene Erreger während des Monitoring.....	47
6.3	LightCycler® SeptiFast Test im Vergleich zur Blutkultur	48
6.3.1	Vergleich der identifizierten Erreger	48
6.3.2	Übereinstimmungsrate, Validität und Vorhersagewerte.....	50
6.4	LightCycler® SeptiFast Test im Vergleich zur Inhouse-Methode.....	51
6.4.1	Vergleich der identifizierten Pilze bei Fieber	51
6.4.2	Vergleich der identifizierten Pilze im Rahmen der Routinekontrollen.....	53
6.4.3	Übereinstimmungsrate, Validität und Vorhersagewerte.....	53
6.4.3.1	Anhand der EORTC-MSG-Kriterien identifizierte invasive Mykosen	54
6.4.3.2	Übereinstimmung von SF-Test und EORTC-MSG-Kriterien	55
6.4.3.3	Übereinstimmung von IH-Methode und EORTC-MSG-Kriterien.....	56
6.4.3.4	Vergleich von SF-Test und IH-Methode.....	57
7	Diskussion.....	58
7.1	Diskussion der Ergebnisse der einzelnen mikrobiologischen Nachweisverfahren ...	58
7.1.1	Blutkulturen.....	58

7.1.2	LightCycler® SeptiFast Test.....	59
7.1.3	Inhouse-Methode	61
7.2	Diskussion der Ergebnisse des SF-Tests im Vergleich zur BK.....	62
7.3	Diskussion der Ergebnisse des SF-Test im Vergleich zur IH-Methode	65
7.4	Limitationen	67
7.5	Schlussfolgerung und Ausblick	67
8	Literaturverzeichnis	69
9	Anhang	83
9.1	Eidesstattliche Versicherung	83
9.2	Lebenslauf	84
9.3	Publikationsliste	85
9.4	Danksagung	86

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Indikationen der allo-SZT	5
Abb. 2: Drei Ziele der Konditionierung	6
Abb. 3: Chronologie der infektiösen Komplikationen.....	8
Abb. 4: Ablauf eines PCR-Zyklus	11
Abb. 5: FRET zwischen Hybridisierungs sonden	12
Abb. 6: Schmelzkurven sowie ihre 1. negative Ableitung (-dF/dT).....	14
Abb. 7: Schema der DNS-Extraktion mittels SF-Test	26
Abb. 8: SeptiFast Kühlblock	27
Abb. 9: Schmelztemperaturen der PCR-Produkte grampositiver Bakterien	28
Abb. 10: Schmelztemperaturen der PCR-Produkte gramnegativer Bakterien.....	29
Abb. 11: Schmelztemperaturen der PCR-Produkte der verschiedenen Pilze	29
Abb. 12: Schema der DNS-Extraktion mittels IH-Methode.....	31
Abb. 13: Vierfeldertafel	36
Abb. 14: Auftreten von Fieber: BK-Ergebnisse und Klinik.....	40
Abb. 15: Anzahl der Erreger, die mittels SF-Test und/ oder BK detektiert wurden.....	48
Abb. 16: Anzahl der Erreger, die mittels SF-Test und/ oder IH-Methode detektiert wurden	52

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Erregerspektrum des SF-Tests	16
Tab. 2: Geräte, Verbrauchsmaterialien und sonstiges Zubehör.....	18
Tab. 3: Anwendungssysteme (Kits)	20
Tab. 4: Puffer	20
Tab. 5: Reagenzien und Kontrollen	21
Tab. 6: Schema der Amplifikation (SF-Test).....	27
Tab. 7: Schema der Schmelzkurvenanalyse (SF-Test).....	28
Tab. 8: Schema der Amplifikation (IH-Methode).....	33
Tab. 9: Schema der Schmelzkurvenanalyse (IH-Methode)	33
Tab. 10: Charakteristische Schmelztemperaturen.....	33
Tab. 11: EORTC-MSG-Kriterien.....	35
Tab. 12: Merkmale der eingeschlossenen Patienten	38
Tab. 13: Ergebnisse der Blutkulturen (BK)	39
Tab. 14: Mittels Blutkultur identifizierte Erreger	41
Tab. 15: Ergebnisse des SF-Tests.....	41
Tab. 16: Detektion von grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie von Pilzen	42
Tab. 17: Mittels SF-Test nachgewiesene Erreger bei Fieber	43
Tab. 18: Mittels SF-Test nachgewiesene Erreger im Rahmen des Monitorings.....	45
Tab. 19: Ergebnisse der IH-Methode	46
Tab. 20: Mittels IH-Methode nachgewiesene Erreger bei Fieber	46
Tab. 21: Mittels IH-Methode nachgewiesene Erreger im Rahmen des Monitoring	47
Tab. 22: Vergleich der mittels SF-Test und BK identifizierten Erreger.....	49
Tab. 23: Vierfeldertafel SF-Test/ BK	50
Tab. 24: Vierfeldertafel SF-Test/ BK unter Ausschluss der Fälle mit Pilzdetektion durch den SF-Test	51
Tab. 25: Validität und Vorhersagewerte des SF-Tests.....	51

Tab. 26: Vergleich der identifizierten Pilze im SF-Test und der IH-Methode bei Fieber	52
Tab. 27: Vergleich der identifizierten Pilze im SF-Test und der IH-Methode in den Routineproben	53
Tab. 28: Patienten mit invasiver Mykose (nach EORTC-MSG-Kriterien).....	54
Tab. 29: Vierfeldertafel SF-Test/ IFD nach EORTC-MSG-Kriterien	55
Tab. 30: Vierfeldertafel SF-Test/ IFD nach EORTC-MSG-Kriterien	56
Tab. 31: Vierfeldertafel IH-Methode/ IFD nach EORTC-MSG-Kriterien.....	56
Tab. 32: Vierfeldertafel IH-Methode/ IFD nach EORTC-MSG-Kriterien.....	57
Tab. 33: Validität und Vorhersagewerte von SF-Test und IH-Methode.....	57

Abkürzungsverzeichnis

AGIHO:	Arbeitsgemeinschaft Infektionen in der Hämatologie und Onkologie
Allo-SZT:	Allogene Stammzelltransplantation
BAL:	Bronchoalveoläre Lavage
BB:	Bindungspuffer
BK:	Blutkultur
Cp:	Crossing Point
CT:	Threshold Cycle
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DGHO:	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DRST:	Deutsches Register für Stammzelltransplantation
EB:	Elutionspuffer
EBMT:	European Group for Bone Marrow Transplantation
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EORTC/MSG:	European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group
FUO:	Fieber unklarer Ursache
FRET:	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GvHD:	Graf-versus-Host-Disease
IA:	Invasive Aspergillose
IC:	Interne Kontrolle
IFD:	Invasive Mykose (Invasive Fungal Disease)
IH-Methode:	Inhouse-Methode
IPA:	Invasive Pulmonale Aspergillose
IRB:	„Inhibitor-Removal“-Puffer
ITS-Region:	Internal-Transcribed-Spacer-Region
KI:	Konfidenzintervall
KMT:	Knochenmarktransplantation
LB:	Lysepuffer
LPE:	Lymphoproliferative Erkrankungen
MDS:	Myelodysplastisches Syndrom
MPS:	Myeloproliferatives Syndrom

NPW:	Negativer prädiktiver Wert
PCR:	Polymerasenkettenreaktion
PPW:	Positiver prädiktiver Wert
SF-Test:	LightCycler® SeptiFast Test
SIRS:	Systemic inflammatory response syndrome
Spp.:	Spezies
SZT:	Stammzelltransplantation
Tm:	Schmelztemperatur
WB:	Waschpuffer

1 Zusammenfassung/ Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die im Rahmen allogener Stammzelltransplantationen (allo-SZT) bei Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen therapeutisch induzierte Immunsuppression geht als Komplikation häufig mit Infektionen durch Bakterien und Pilze einher. Als Goldstandard der Erregerdiagnostik gilt die Blutkultur (BK), wobei hier nur in etwa einem Viertel der Blutproben von Patienten mit Fieber in der Phase der Granulozytopenie Erreger nachweisbar sind.

Ziel dieser Studie war die prospektive Evaluation des LightCycler® SeptiFast Tests (SF-Test), eines kommerziell erhältlichen Multiplex-PCR-Verfahrens zum Nachweis der 25 häufigsten Sepsiserreger (Bakterien und Pilze) aus dem Vollblut, bei hämatologisch-onkologischen Patienten nach allo-SZT im Vergleich zur BK und einer pilzspezifischen Inhouse-PCR-Methode (IH-Methode).

Von 104 Patienten nach allo-SZT wurden insgesamt 847 Blutproben (225 Proben bei Fieber, 622 wöchentliche Routineproben) gewonnen und mittels SF-Test und IH-Methode untersucht sowie 205 bei Fieber angelegte Blutkulturen analysiert.

Bei Fieber war der SF-Test in 26,2% (59/225), die BK in 19,2 % (38/198) der Fälle positiv. Insgesamt waren 74 Erreger mittels SF-Test und/oder BK nachweisbar (SF-Test + BK: n=24, nur SF-Test: n=34, nur BK: n=16). Beide Methoden detektierten jeweils am häufigsten die bakteriellen Erreger *CoNS* und *Escherichia coli*, polymikrobielle Infektionen waren mittels BK bei einem, mittels SF-Test bei vier septischen Patienten nachweisbar. Bei kulturell gesicherter bakterieller Sepsis war der SF-Test in fünf Fällen falsch negativ. Die Übereinstimmungsrate von SF-Test und BK lag bei 86,6 %. Im Vergleich zur BK als Goldstandard erreichte der SF-Test eine Sensitivität von 66 %, eine Spezifität von 91 %, einen positiven Vorhersagewert (PPV) von 62 % und einen negativen Vorhersagewert (NPV) von 92 %.

Während die BK für Pilze negativ ausfielen, waren mittels SF-Test und/oder IH-Methode bei Fieber 28 Pilze (SF-Test + IH-Methode: n=2, nur SF-Test: n=20, nur IH-Methode: n=6) und im Rahmen der Routineproben (kein Fieber) 60 Pilze (SF-Test + IH-Methode: n=0, nur SF-Test: n=8, nur IH-Methode: n=52), vorwiegend *Candida albicans*, nachweisbar. Nach EORTC-MSG-Diagnosekriterien wiesen 15/104 Patienten (6,9 %) eine wahrscheinliche (n=2) oder mögliche (n=13) invasive Mykose (IFD) auf. SF-Test (n=9) und IH-Methode (n=1) bestätigten eine der beiden wahrscheinlichen IFD (invasive pulmonale Aspergillose). SF-Test und IH-Methode zeig-

ten (gegenüber den EORTC-MSG-Kriterien) mit 98,3% bzw. 97,2 % einen hohen NPV und mit 99,3 % bzw. 93,4 % eine hohe Spezifität. PPV (60,0 %) und Sensitivität (39,1 %) des SF-Tests waren mäßig, PPV und Sensitivität der IH-Methode gering (PPV=1,9 %, Sensitivität=4,3 %). Zusammenfassend bietet der SF-Test eine schnelle Möglichkeit der Erregerdetektion aus dem Vollblut und stellt damit eine sinnvolle **ergänzende** Methode, insbesondere zur Identifikation polymikrobieller und fungaler Infektionen, bei hämatologisch-onkologischen Patienten nach allo-SZT dar.

1.2 Abstract

The therapeutically induced immunosuppression within the context of allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) in patients with haematological/oncological diseases is frequently accompanied as a complication by bacterial and fungal infections. Blood culture (BC) is considered the gold standard in pathogen diagnostics, though pathogens are detectable in this case in only approximately a quarter of blood samples from patients with fever in the granulocytopenic phase.

The aim of this study was prospective evaluation of the LightCycler® SeptiFast Test (SF-Test), a commercially available Multiplex PCR method for detecting the 25 most frequent sepsis-causing pathogens (bacteria and fungi) from whole blood, in oncohaematological patients undergoing allo-SCT compared to BC and a fungus-specific in-house PCR method (IH-Method).

A total of 847 blood samples were obtained from 104 patients undergoing allo-SCT (225 samples during fever, 622 weekly surveillance samples) and were analyzed using the SF-Test and IH-Method; in addition, 205 BC were taken and analyzed when fever occurred.

During fever, the SF-Test was positive in 26.2% (59/225) of cases and BC in 19.2 % (38/198) of cases. A total of 74 pathogens were detectable using the SF-Test and/or BC (SF-Test + BC: n=24, only SF-Test: n=34, only BC: n=16). Both methods respectively most frequently detected the bacterial pathogens *CoNS* and *Escherichia coli*; polymicrobial infections were detectable in one septic patient by BC and in four by SF-Test. In bacterial sepsis confirmed by culture, the SF-Test was falsely negative in five cases. The concordance rate of the SF-Test and BC was 86.6%. In comparison to BC as the gold standard, the SF-Test achieved a sensitivity of 66%, a specificity of 91%, a positive predictive value (PPV) of 62% and a negative predictive value (NPV) of 92%. Whereas the BC were negative for fungi, 28 fungi were detectable during fever using SF-Test and/or IH-Method (SF-Test + IH-Method: n=2, only SF-Test: n=20, only IH-Method: n=6) and 60 fungi during surveillance (SF-Test + IH-Method: n=0, only SF-Test: n=8, only IH-Method: n=52), predominately *Candida albicans*. According to EORTC/MSG diagnostic criteria, 15/104

patients (6.9 %) presented with a probable (n=2) or possible (n=13) invasive mycosis (IFD). SF-Test (n = 9) and IH-Method (n = 1) confirmed one of two probable IFDs (invasive pulmonary aspergillosis). SF-Test and IH-Method showed (with regard to EORTC/MSG criteria) with respectively 98.3% and 97.2% a high NPV and with 99.3% and 93.4% a high specificity. PPV (60.0 %) and sensitivity (39.1 %) of the SF-Test were moderate; PPV and sensitivity of the IH-Method were low (PPV=1.9 %, sensitivity =4.3 %).

In summary, the SF-Test offers a rapid possibility for pathogen detection based on whole blood and therefore represents a useful **supplementary** method, particularly for identification of polymicrobial and fungal infections in oncohaematological patients undergoing allo-SCT.

2 Einleitung

Für Patienten mit hämatologisch-onkologischer Grunderkrankung stellt die allogene Stammzelltransplantation eine mögliche, potenziell kurative Therapieoption dar und wird heutzutage routinemäßig, insbesondere bei Leukämien, durchgeführt [Deutsches Register für Stammzelltransplantation, Jahresbericht 2014]. Neben immunologischen Abwehrreaktionen und Versagen des Transplantates, ist vor allem das Auftreten von Infektionen eine gefürchtete Komplikation. Ein schneller und korrekter Erregernachweis ist daher von essentieller Bedeutung, um die Einleitung einer adäquaten antimikrobiellen Therapie zu ermöglichen. Neben der Blutkultur als mikrobiologische Standardmethode des Erregernachweises, gilt mittlerweile die Polymerasekettenreaktion (PCR) als vielversprechende molekularbiologische Methode zur Identifikation von Erregern aus dem Blut. Zahlreiche nicht-kommerzielle Protokolle haben diesen Ansatz bereits verfolgt. Als erstes kommerziell erhältliches und standardisiertes Testverfahren konnte das SeptiFast-Testsystem der Firma Roche auf den Markt gebracht werden. Eine Evaluierung dieses Systems bei hämatologisch-onkologischen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation liegt bisher allerdings noch nicht vor und soll Ziel dieser Arbeit sein.

2.1 Allogene Stammzelltransplantation

2.1.1 Epidemiologie und Indikationen

Die allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT), das heißt die Transplantation körperfremder Stammzellen, stellt eine potenziell kurative Therapieoption bei zahlreichen hämatologischen und nicht-hämatologischen Erkrankungen dar. Thomas et al. berichteten bereits 1959 über die Transplantation von Knochenmark nach Ganzkörperbestrahlung bei zwei Patientinnen, die an einer therapierefraktären akuten Leukämie erkrankt waren. Damals konnten Remissionen von sieben beziehungsweise zwölf Wochen erreicht werden [Thomas et al. 1959]. Seit dieser Pionierarbeit hat die Zahl der SZT stetig zugenommen. Basierend auf Daten der „European Group for Bone Marrow Transplantation“ (EBMT), berichten Passweg et al. von insgesamt 32075 Patienten, die alleine in Europa im Jahre 2011 mittels Transplantation hämatopoetischer Stammzellen therapiert worden sind. In 13470 Fällen (42%) handelte es sich dabei um eine allo-SZT. Damit hat sich die Zahl dieser Behandlungsform in den letzten zehn Jahren annähernd verdoppelt [Passweg et al. 2013]. Auch in Deutschland zeigt sich dem Jahresbericht 2014 des Deutschen Registers für Stammzelltransplantation (DRST) zufolge, ein Anstieg der jährlich durchgeführten allo-SZT von

insgesamt 1207 im Jahr 1998 auf 3220 im Jahr 2014. Hauptindikationen stellten akute und chronische Leukämien dar (akut: 50,6 %, chronisch: 5,0 %). Auch myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome (MDS: 15,6 % und MPS: 4,7 %), sowie lymphoproliferative Erkrankungen (LPE: 17,0 %) und seltener auch solide Tumore (0,5 %), wie das Neuroblastom, waren Indikationen für eine allo-SZT. Ferner wurde diese Behandlungsmethode zur Therapie nicht-maligner hämatologischer und anderer Erkrankungen (6,4 %) eingesetzt. Beispiele sind schwere aplastische Anämien, Thalassämien, primäre Immundefekte und verschiedene Autoimmunerkrankungen [DRST Jahresbericht 2014]. Einen Überblick über die genannten Indikationen gibt Abb. 1.

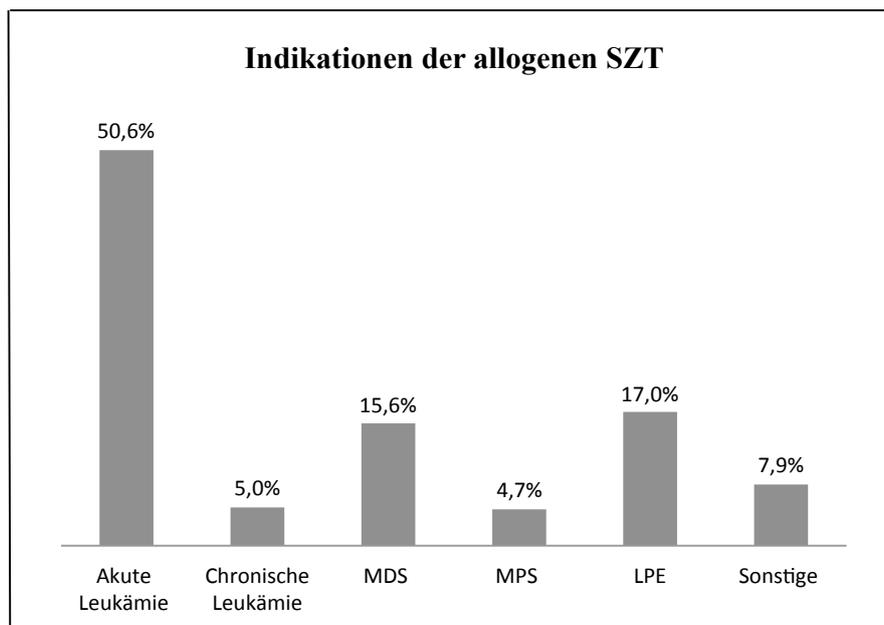


Abb. 1: Indikationen der allo-SZT [modifiziert nach dem DRST Jahresbericht 2014]

2.1.2 Prinzip der allo-SZT

Im Rahmen der allo-SZT erfolgt zunächst die sogenannte Konditionierungstherapie. Bei den standardmäßig durchgeführten Regimes handelt es sich um eine hochdosierte Chemotherapie oder eine Kombination aus Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung. Abb. 2 veranschaulicht die drei Hauptziele dieser Vorbehandlung: Die Myeloablation ist notwendig, um Raum für die Ansiedlung der gespendeten Stammzellen zu schaffen, die Immunsuppression soll eine Absto-

ßung des Transplantates verhindern und ein antileukämischer Effekt die Tumorzellen beseitigen [Kröger & Zander et al. 2011].

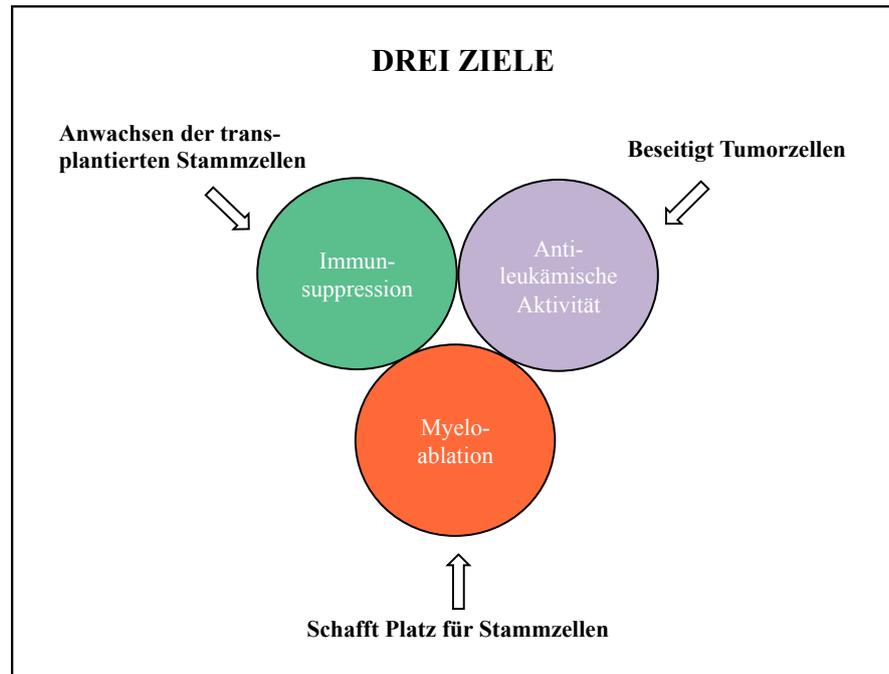


Abb. 2: Drei Ziele der Konditionierung [modifiziert nach Kröger & Zander et al. 2011, S.89]

Nach der Konditionierungstherapie erfolgt die Transplantation der aus dem Knochenmark [Thomas et al. 1959], dem peripheren Blut [Russell et al. 1993] oder aus Nabelschnurblut [Gluckman et al. 1989] des Spenders gewonnenen Stammzellen. Die kanadischen Wissenschaftler McCulloch und Till definierten Stammzellen bereits im Jahre 1963 als Zellen, die zur Selbsterneuerung fähig sind und in weiter spezialisierte Zellen ausreifen können [Till & McCulloch 1963, Till et al. 1964]. Die Übertragung hämatopoetischer Stammzellen ermöglicht somit die Regeneration der durch Chemo- und Strahlentherapie zuvor ausgelöschten Hämatopoese des Transplantatempfängers. Das erfolgreiche Anwachsen des Transplantates („Engraftment“) spiegelt sich in einem Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten auf $> 500/\mu\text{l}$ innerhalb von 28 Tagen post transplantationem wider [Kröger & Zander 2011]. Neben der beschriebenen Regenerationsfähigkeit wird der allogenen SZT selbst ein sogenannter Spender-gegen-Leukämie-Effekt, das heißt ein immunologisch bedingter antileukämischer Effekt zugeschrieben, der residuale Tumorzellen nach Konditionierungstherapie beseitigt und damit die Rückfallrate der Empfänger hinsichtlich ihrer Grunderkrankung minimiert [Weiden et al. 1979, Horowitz et al. 1990].

2.1.3 Infektionen nach allo-SZT

Infektionen stellen eine schwerwiegende und häufige Komplikation nach allo-SZT dar. Nach Collin et al. liegt die Inzidenz bakterieller Infektionen nach SZT bei 29,5 % [Collin et al. 2001]. Der Anteil infektionsbedingter Todesfälle nach allo-SZT wird in einer großen Studie der EBMT mit 11 % angegeben (597 von 5377 nach allo-SZT verstorbene Patienten) [Gratwohl et al. 2005]. Das Spektrum der Infektionen nach allo-SZT ist breit und zeigt einen von der Posttransplantationsphase abhängigen zeitlichen Verlauf (Abb. 3). Unterschieden werden eine frühe, eine mittlere und eine späte Posttransplantationsphase [Einsele et al. 2003, Wingard 1999, Hiemenz 2009].

1. Frühe Posttransplantationsphase (Phase I):

Dies entspricht der Phase vor dem „Engraftment“ mit einer Dauer von etwa einem Monat. Risikofaktoren für die erhöhte Infektanfälligkeit sind Granulozytopenie, Schleimhautschädigungen und die Anlage intravenöser Katheter. Mit einem prozentualen Anteil von etwa 90 % dominieren bakterielle Erreger. Dabei handelt es sich in 65 – 75 % um, oftmals katheterassoziierte, Infektionen durch grampositive Bakterien, wie *Staphylokokken* und *Streptokokken* [Einsele et al. 2003]. Bei Pilzinfektionen stehen in dieser Phase *Candida speziez (spp.)*, bei Virusinfektionen das *Herpes-simplex-Virus* im Vordergrund [Wingard 1999, Hiemenz 2009].

2. Mittlere Posttransplantationsphase (Phase II):

Phase von der hämatopoetischen Rekonstruktion bis zum Tag +100 nach Transplantation. Das Infektionsrisiko ist in dieser Phase aufgrund der verzögerten immunologischen Regeneration mit eingeschränkter B- und T-Zell-Funktion erhöht [Einsele et al. 2003]. Nach Anstieg der neutrophilen Granulozyten sind Infektionen durch Bakterien zwar insgesamt seltener; katheterassoziierte Infektionen durch grampositive Bakterien und Infektionen durch gramnegative Bakterien bei Schleimhautschädigungen im Rahmen einer akuten Graft-versus-Host-Disease (GvHD) kommen aber weiterhin vor [Wingard 1999]. Bei 60 – 70 % der seropositiven Patienten kommt es in dieser Phase zu einer Reaktivierung des *Cytomegalievirus* [Einsele et al. 2003]. Auch Pilzinfektionen durch *Candida spp.* und, mit zunehmender Häufigkeit, auch *Aspergillus spp.*, sowie weitere Fadenpilzinfektionen (zum Beispiel Zygomycosen) treten in dieser Phase auf [Hiemenz 2009, Ruhnke 2011].

3. Späte Posttransplantationsphase (Phase III):

Dies entspricht der Phase ab dem Tag +100 nach Transplantation. Risikofaktor für Infektionen ist, neben der verzögerten immunologischen Rekonstruktion, die Entwicklung einer chronischen GvHD. Im Vordergrund stehen kapselbildende Bakterien wie *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Neisseria meningitides*, die zu rezidivierenden Infektionen des Respirationstraktes führen [Einsele et al. 2003, Wingard 1999, Hiemenz 2009]. Auch Pilzinfektionen können weiterhin auftreten. In einer ungarischen Autopsiestudie wurden die Krankengeschichten von insgesamt 97 Patienten nach allogener SZT analysiert. Auf das gesamte Kollektiv bezogen verstarben 10 % der Transplantatempfänger an einer invasiven Mykose (60 % *Aspergillus spp.*). Die Mehrheit der durch Pilze bedingten Todesfälle trat ab dem Tag +100 nach Transplantation auf [Sinkó et al. 2008]. Eine Reaktivierung des *Varizella-Zoster-Virus* wurde in dieser Phase bei ca. 40 – 50 % der Patienten beobachtet [Hiemenz 2009].

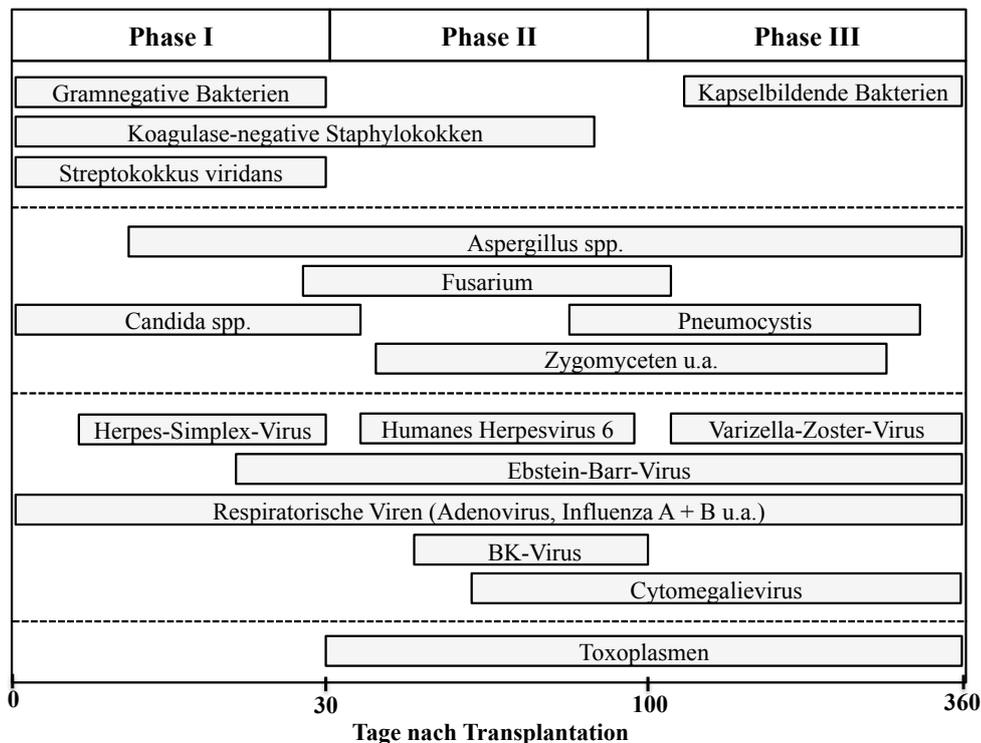


Abb. 3: Chronologie der infektiösen Komplikationen [modifiziert nach Hiemenz, 2009, S. 298]

2.2 Mikrobiologische Diagnostik bakterieller und fungaler Infektionen

Der sofortige Beginn einer erregergerechten Therapie ist essentiell für den Krankheitsverlauf von Patienten mit unklarem Fieber (FUO) und/ oder Sepsis. In ihrer prospektiven Studie aus dem Jahr 2000 untersuchten Ibrahim et al. 492 Patienten mit Sepsis. 29,9 % der Patienten erhielt eine nicht erregergerechte antimikrobielle Therapie. Es konnte gezeigt werden, dass die Sterblichkeitsrate der Patienten mit inadäquater Therapie (61,9 %) signifikant höher lag, als diejenige von Patienten mit adäquater antimikrobieller Therapie (28,4 %) [Ibrahim et al. 2000]. Die Identifizierung des infektionsauslösenden Erregers ist also von grundlegender Bedeutung für die Einleitung einer geeigneten antimikrobiellen Therapie und den weiteren Krankheitsverlauf der Patienten. Neben der Erregerdiagnostik mittels konventioneller Blutkultur (BK) gewinnen seit einiger Zeit auch molekularbiologische Verfahren wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) zunehmend an Bedeutung.

2.2.1 Blutkulturen

Blutkulturen stellen den Goldstandard in der mikrobiologischen Diagnostik zum Erregernachweis aus dem Blut dar. Allgemeine Indikationen zur Durchführung von Blutkulturen sind unter anderem der klinische Verdacht auf eine Sepsis sowie der Verdacht auf systemische Mitbeteiligung bei lokalisierten Infektionen, zyklische Infektionskrankheiten (zum Beispiel Typhus oder Brucellose), Bakteriämien/ Fungämien (zum Beispiel im Rahmen einer Endokarditis oder einer katheterassoziierten Infektion) und bei Fieber unklarer Genese (FUO) [Seifert et al. 2007; Link et al. 2003]. Für Patienten mit Fieber in der Granulozytopenie empfiehlt die Arbeitsgemeinschaft Infektionen in der Hämatologie und Onkologie (AGIHO) der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) die sofortige Abnahme von zwei Blutkulturpaaren aus peripherem venösem Blut bzw. zusätzlich aus einem möglichen zentralen Venenkatheter. Unmittelbar im Anschluss soll mit der empirischen antimikrobiellen Therapie begonnen werden [Link et al. 2003]. Etwa 50 % der Fieberepisoden von Patienten in der Granulozytopenie sind infektiös bedingt (weitere 45 – 50 % ordnen sich einem FUO und < 5 % nicht-infektiösen Ursachen zu). Ein kultureller Erregernachweis gelingt allerdings nur in 20 – 25 % [Link et al. 2003, Neshor & Rolston 2014]. Noch niedriger liegt der Anteil identifizierter Erreger unter bereits begonnener antimikrobieller Therapie. Serody et al. evaluierten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2000 die Inzidenz positiver Blutkulturen bei 145 Patienten mit Fieber in der Granulozytopenie nach SZT unter antibiotischer Prophylaxe. Nur 11% der initial abgenommenen Kulturen zeigten ein positives

Ergebnis [Serody et al. 2000]. Der Arbeitsgruppe um Glerant et al. gelang sogar gar kein kultureller Erregernachweis aus dem Blut, wenn die Patienten schon vor Blutkulturabnahme mit einer antimikrobiellen Therapie begonnen hatten [Glerant et al. 1999]. Eine weitere Schwierigkeit stellen langsam wachsende und schwer anzüchtbare Mikroorganismen dar. Während langsam wachsende Erreger wie *Mykobakterien* oder *Bartonella spp.* eine deutlich verlängerte Inkubationszeit benötigen, sind anspruchsvolle Erreger wie *Legionellen* oder *Mykoplasmen* gar nicht anzüchtbar [Peters et al. 2004]. Problematisch ist auch die kulturelle Detektion von Pilzen. Teixeira et al. weisen darauf hin, dass bei Patienten mit Fieber in der Granulozytopenie nur in 5 – 10 % der Proben ein positives Blutkulturergebnis für Pilze erzielt wird [Teixeira et al. 2014]. Während Patienten mit invasiver Candidose in etwa 50 % der Fälle ein negatives Blutkulturergebnis zeigen [Clancy & Hong Nguyen 2013], fällt das kulturelle Ergebnis für *Aspergillus spp.* nahezu immer negativ aus [Teixeira et al. 2014, Simoneau et al. 2005].

2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Kary Banks Mullis entwickelte 1983 mit der PCR eine Methode, mittels derer die Vervielfältigung eines definierten Segmentes Desoxyribonukleinsäure (DNS) möglich gemacht wurde [Mullis et al. 1987, Saiki et al. 1985]. Auch kleinste Mengen genetischen Materials können mit dieser Methode derart vermehrt werden, dass genügend Material zur Verfügung steht, um eine weitere Charakterisierung und Analyse durchführen zu können. Anwendungsgebiete sind, neben dem Erregernachweis, unter anderem die Detektion genetisch bedingter Erkrankungen, der Nachweis chromosomaler Alterationen bei zahlreichen hämatologischen und/ oder onkologischen Erkrankungen sowie die forensische Analytik [Young 1992, Roper et al. 2008].

2.2.2.1 Grundprinzip des PCR-Zyklus

Um ein DNS-Segment zu vervielfältigen, sind Primer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), eine hitzestabile DNS-Polymerase und Puffer notwendig. Jeder PCR-Zyklus besteht aus den Schritten Denaturierung, „Annealing“ und Elongation (Abb. 4). Zuerst erfolgt die Denaturierung des DNS-Doppelstranges durch Erhitzen auf 95°C. Hierdurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren getrennt; die DNS liegt somit in zwei Einzelsträngen vor. Im zweiten Schritt, dem „Annealing“, lagern sich die Primer, in Abhängigkeit von ihrer Länge und Zusammensetzung, bei Temperaturen von etwa 55°C an die gewählte Zielsequenz beider Einzelstränge an. Durch Anhängen weiterer Nukleotide bei ca. 72°C wer-

den die Primer zu komplementären DNS-Tochtersträngen verlängert. Dieser Vorgang wird durch die DNS-Polymerase katalysiert und als Elongation bezeichnet. Der PCR-Zyklus wird mehrfach wiederholt und generiert so eine wachsende Zahl an Kopien der ursprünglich eingesetzten DNS-Probe, die anschließend für weitere Analyseverfahren zur Verfügung stehen [Baumforth et al. 1999, Kubista et al. 2006].

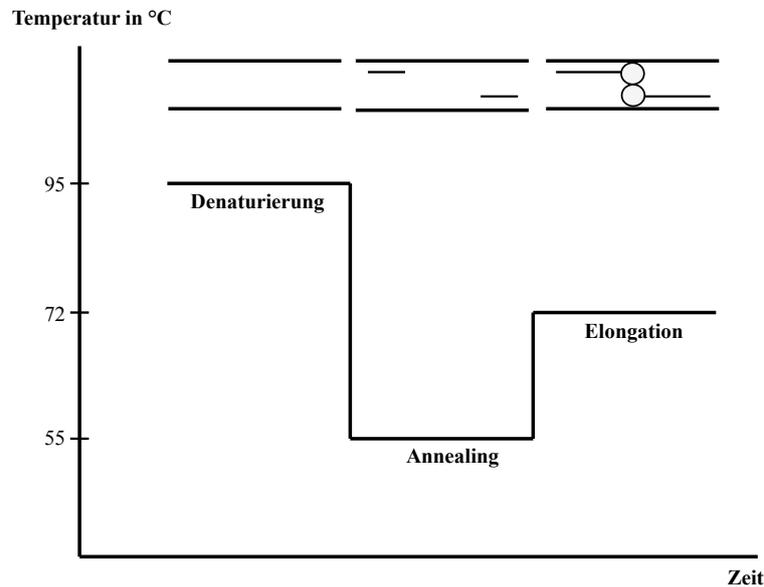


Abb. 4: Ablauf eines PCR-Zyklus [modifiziert nach Kubista et al. 2006, S. 97]

2.2.2.2 Grundprinzip der „Real-Time“ PCR

Im Jahre 1996 entwickelten Heid et al. eine neue „Real-Time“ PCR-Methode. Diese ermöglicht schon während der Amplifikation, also in „Echt-Zeit“, die quantitative Bestimmung der erzeugten Kopien [Heid et al. 1996]. Das Verfahren beruht auf der Messung eines Fluoreszenzsignals, das entweder von Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Sonden emittiert wird und proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes ansteigt. Der Zyklus, bei dem ein eindeutiges, über die Hintergrundfluoreszenz hinausgehendes Signal gemessen wird, wird durch den sogenannten CT-Wert („threshold cycle“) markiert. Durch Vergleich des gemessenen CT-Wertes mit dem einer Standardprobe, deren Targetkonzentration bekannt ist, kann dann auf die Anfangskonzentration der vervielfältigten DNS geschlossen werden [Kubista et al. 2003, Wilhelm und Pingoud 2003]. Mittlerweile haben sich zahlreiche Detektionformate auf dem Markt etabliert. Grundsätzlich unterscheidet man Formate, die interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie zum

Beispiel SYBR Green I, verwenden und solche, die mit fluoreszenzmarkierten sequenzspezifischen Sonden arbeiten [Wilhelm und Pingoud 2003]. SYBR Green I ist kostengünstig, birgt aber den Nachteil auch an unspezifische PCR-Produkte, wie Primer-Dimeren, zu binden und somit ggf. die Quantifizierung des Produktes und des Ausgangsmaterials zu verfälschen. Dem gegenüber stehen die sequenzspezifischen Sonden, die nur dann ein Fluoreszenzsignal erzeugen, wenn ein spezifisches PCR-Produkt vorliegt [Kubista et al. 2006]. Diese Eigenschaft sequenzspezifischer Sonden bietet zudem die Möglichkeit, eine Multiplex-PCR mit Amplifikation und Detektion verschiedener DNS-Segmente parallel in nur einer Reaktion durchzuführen [Wittwer et al. 2001]. Beispiele für speziesspezifische Sonden sind Hybridisierungssonden, Hydrolysesonden („Taqman-Sonden“) und Molekulare „beacons“ [Kubista et al. 2006, Wilhelm und Pingoud 2003]. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit soll an dieser Stelle das Prinzip der Hybridisierungssonden näher erläutert werden (Abb. 5).

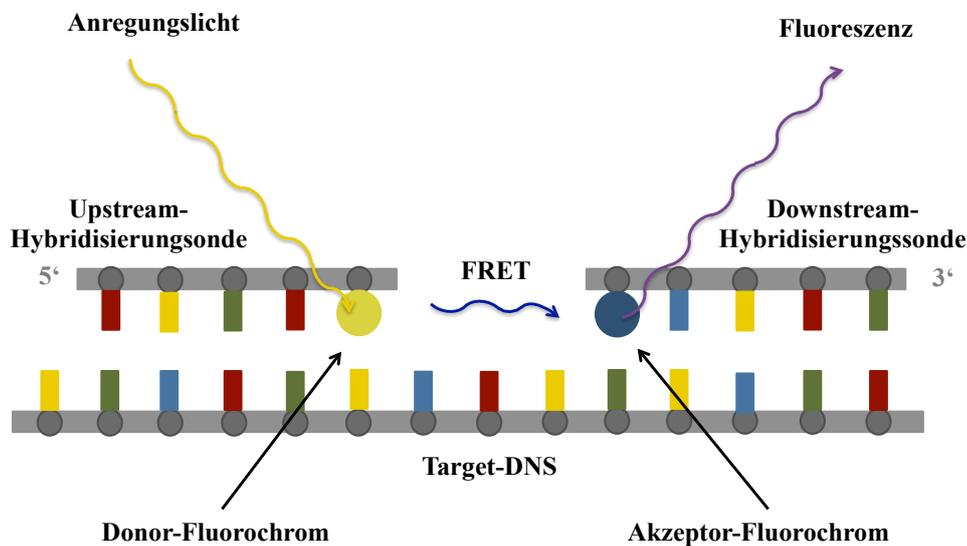


Abb. 5: FRET zwischen Hybridisierungssonden [Roche Diagnostics GmbH 2008, S.54]

Dieses basiert auf dem 1948 von Theodor Förster beschriebenen abstandsabhängigen Energie-transfer zwischen zwei benachbarten Molekülen, dem sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [Förster 1948]. 1988 verwendeten Cardullo et al. den FRET erstmals, um hybridisierte Nukleinsäuren in Lösung zu detektieren [Cardullo et al. 1988]. Eine Hybridisie-

rungssonde besteht aus zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die in direkter Nachbarschaft an die Zielsequenz binden und jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Der eine Teil der Sonde enthält ein Fluorochrom, welches als Donor fungiert, der andere eines, das den Akzeptor darstellt. Wird das Donor-Fluorochrom durch eine externe Lichtquelle angeregt, überträgt es die absorbierte Energie auf das benachbarte Akzeptor-Fluorochrom, welches dann ein Fluoreszenzsignal bestimmter Wellenlänge emittiert. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der hybridisierten Sonden und somit zur Menge des spezifischen PCR-Produktes [Roche Diagnostics GmbH 2008].

Nach einer „Real-Time“ PCR können die PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse weitergehend bewertet werden. Dabei macht man sich die Eigenschaft doppelsträngiger DNS zunutze, bei einer für sie charakteristischen Schmelztemperatur (T_m) in zwei Einzelstränge aufzuschmelzen [Wittwer et al. 2001]. Diese ist sowohl vom Gehalt an Guanin-Cytosin-Basenpaarungen als auch von der Länge und der Sequenz der Nukleinsäure abhängig [Ririe et al. 1997]. Interessant ist dieses Verhalten zum einen, um beim Einsatz interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten zu unterscheiden, und zum anderen, um bei Verwendung von Hybridisierungssonden das spezifische PCR-Produkt genauer zu identifizieren. Praktisch kommt es durch Erhöhung der Temperatur nach abgelaufener PCR im Falle von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen bei einer charakteristischen Temperatur zum Schmelzen der doppelsträngigen PCR-Produkte und somit zur Freisetzung des Farbstoffes. Dies resultiert in der Abnahme des Fluoreszenzsignals. Unspezifische Produkte, wie beispielsweise Primer-Dimere, schmelzen bei einer geringeren Temperatur als spezifische Produkte und können somit durch Ermittlung der Schmelztemperatur differenziert werden [Ririe et al. 1997, Wittwer et al. 2001, Kubista et al. 2006]. Im Falle von Hybridisierungssonden kommt es durch die Temperaturerhöhung zum Abschmelzen der Sonde vom PCR-Produkt-Einzelstrang. Auch hieraus ergibt sich eine Abnahme des gemessenen Fluoreszenzsignals. Da Hybridisierungssonden hoch spezifisch für eine Sequenz sind, kann die charakteristische Temperatur, bei der es zum Abschmelzen kommt, herangezogen werden, um die verschiedenen PCR-Produkte zu identifizieren. Neben der bereits beschriebenen Eigenschaft sequenzspezifischer Hybridisierungssonden, nur dann ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen, wenn ein spezifisches PCR-Produkt vorliegt, lässt sich also auch ihr typisches Schmelzverhalten für die Durchführung einer Multiplex-PCR verwenden [Wittwer et al. 2001]. Graphisch lässt sich die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Temperatur als Schmelzkurve darstellen. Die erste negative Ableitung dieser Kurve zeigt in ihrem Maximum die charakteristische Schmelztemperatur des PCR-Produktes an (Abb. 6) [Ririe et al. 1997].

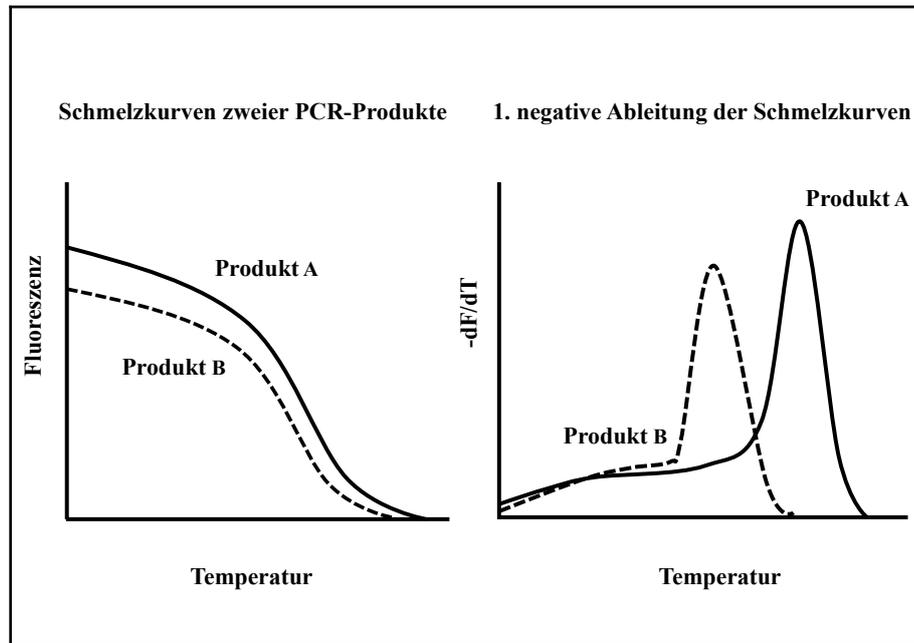


Abb. 6: Schmelzkurven sowie ihre 1. negative Ableitung ($-dF/dT$) [modifiziert nach Ririe et al. 1997, S. 157]

2.2.2.3 PCR in der Erregerdiagnostik

PCR-basierte Testverfahren zum Nachweis von Erregern direkt aus dem Blut wurden in den vergangenen 20 Jahren in zunehmendem Umfang konzipiert. Song et al. gelang bereits 1993 mittels PCR der Nachweis von *Salmonella typhi*. Im Vergleich zur Blutkultur konnte eine Sensitivität von 92 % erzielt werden [Song et al. 1993]. Weitere, erregerspezifische PCR-Verfahren konnten in den folgenden Jahren mit Sensitivitäten von bis zu 100 % beispielsweise für den Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* [Schluger et al. 1994], *Neisseria meningitides* [Newcombe et al. 1996, Guiver et al. 2000] und *Escherichia coli* [Heininger et al. 1999] aus Vollblut, Serum, Plasma oder Liquor publiziert werden. Auch für die Detektion von Pilzinfektionen (insbesondere von invasiven Aspergillosen) konnten Sensitivitäten von 75 - 100 % erreicht werden [Tang et al. 1993, Morace et al. 1999, Lass-Flörl et al. 2001, Buchheidt et al. 2002, Maaroufi et al. 2003]. Bei neu diagnostizierter Invasiver Aspergillose (IA) konnten Hebart et al. herausstellen, dass die PCR sogar bereits zwei Tage vor Auftreten klinischer Symptome und neun Tage vor Auftreten typischer radiologischer Zeichen, ein positives Ergebnis aufweist [Hebart et al. 2000].

Besteht der Verdacht auf eine Sepsis, müssen zahlreiche auslösende Erreger in Betracht gezogen werden. Die Amplifikation und Detektion mehrere Erreger parallel in einem Ansatz lässt sich durch sogenannte Breitspektrum- bzw. Multiplex-PCR-Verfahren gewährleisten. Diese verwen-

den entweder universelle Primer, die häufig an konservierte Regionen des bakteriellen 16S rDNS-Gens [Jordan et al. 2000, Ott et al. 2004, Zucol et al. 2006] oder analog des fungalen 18S rDNS-Gens [Einsele et al. 1997, El-Mahallawy et al. 2006] binden und somit zu einer generellen Amplifikation mikrobieller DNS führen, oder speziesspezifische Primer, die durch Bindung an speziesspezifische Zielsequenzen, wie der nicht-kodierenden, sehr heterogenen ITS (Internal-Transcribed-Spacer)-Region, zu einer gezielten Vervielfältigung führen [Carvalho et al. 2007]. Die Identifikation der Spezies gelingt im Anschluss durch Sequenzierung oder Hybridisierung. Auch die Durchführung im „Real-Time“ Format mit simultaner Detektion und Differenzierung mittels speziesspezifischer Sonden wurde beschrieben [Yang et al. 2002, Schabereiter-Gurtner et al. 2008, Fernandez-Molina et al. 2014]. Hunfeld et al. verglichen in ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2008 mehrere Breitspektrum- und Multiplex-PCR-Verfahren zum Nachweis bakterieller Erreger und konnten, abhängig vom Patientenkollektiv, Sensitivitäten von 54 - 100 % dokumentieren [Hunfeld et al. 2008]. Für die Pilzdiagnostik wurden ebenfalls einige Breitspektrum- und Multiplex- Verfahren publiziert. Obwohl eine Evaluation unter klinischen Bedingungen bislang noch nicht vorliegt, zeigt sich insbesondere das Protokoll der österreichischen Arbeitsgruppe um Schabereiter-Gurtner et al. vielversprechend. Dieses ermöglicht unter Verwendung gruppenspezifischer und universeller Primer in Kombination mit speziesspezifischen Sonden, die Differenzierung von fünf *Candida-Spezies* und sechs *Aspergillus-Spezies* [Schabereiter et al. 2007]. Neben den bisher genannten, nichtkommerziellen Verfahren, die für die Routine-Anwendung oft zu aufwendig und zu wenig standardisiert sind, wurden mittlerweile auch einige wenige kommerzielle, standardisierte Breitspektrum- und Multiplex-Verfahren auf den Markt gebracht. Im Einzelnen können zum Beispiel der SepsiTestTM von Molzym (Bremen, Deutschland), der Vyoo® Test von SIRS-Lab (Jena, Deutschland), der MagicplexTM Sepsis Real-time Test von Seegene (Seoul, Korea) und der LightCycler® SeptiFast Test von Roche (Mannheim, Deutschland) genannt werden [Mancini et al. 2010, Skvarc et al. 2013, Liesenfeld et al. 2014].

2.2.2.4 LightCycler® SeptiFast Test

Der LightCycler® SeptiFast Test (SF-Test) der Firma Roche konnte 2005 als erstes kommerziell verfügbares Multiplex-PCR-Verfahren im „Real-Time“ Format auf dem Markt etabliert werden. In der aktuellen Testversion können durch Amplifikation und Detektion speziesspezifischer Abschnitte der ITS-Region innerhalb von nur sechs Stunden 25 der häufigsten Sepsiserreger direkt aus EDTA-Blut nachgewiesen und softwaregestützt mittels Schmelzkurvenanalyse identifiziert

werden (siehe Tab. 1). Die Verwendung von Vollblut bietet den Vorteil, dass auch phagozytierte Pathogene in die Analyse einbezogen werden [Lehmann et al. 2008].

Mehrere Arbeitsgruppen haben den SF-Test bereits bei hämatologisch-onkologischen Patienten evaluiert und geschlussfolgert, dass der SF-Test möglicherweise bei persistierendem, BK-negativem Fieber und unter antimikrobieller Therapie von diagnostischem Wert sein könnte [von Lilienfeld-Toal et al. 2009, Mancini et al. 2008, Lamoth et al. 2010]. Eine größere Untersuchung bei hämatologisch-onkologischen Patienten nach allo-SZT liegt bislang noch nicht vor.

Tab. 1: Erregerspektrum des SF-Tests
[LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}, Roche Diagnostics GmbH 2009, S. 1]

Gram-negative Bakterien	Gram-positive Bakterien	Pilze
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella (pneumoniae/ oxytoca)</i>	<i>Coagulase-negative Staphylococci</i> *	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (cloacae/ aerogenes)</i>	<i>Streptococcus spp.</i> **	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecialis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

* *Coagulase-negative Staphylococci*: *S. hominis* subsp. *Novobiosepticus*, *S. warneri*, *S. cohnii* susp. *urealyticum*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. capitis* subsp. *ureolyticus*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. caprae*, *S. saprophyticus*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. xylosum*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*

** *Streptococcus spp.*: *S. agalacticae*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. constellatus*, *S. gordii*, *S. intermedius*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. thermophilus*, *S. vestibularis*, *S. viridans*

2.3 Zielsetzung

In den letzten Jahren hat die Anzahl der allo-SZT stetig zugenommen. Insbesondere in der frühen Posttransplantationsphase ist das Risiko für die Entwicklung bakteriell bedingter Infektionen erhöht. Auch Pilzinfektionen spielen eine zunehmende Rolle. Der frühzeitige Beginn einer erregergerechten Therapie ist für den weiteren Krankheitsverlauf von besonderer Bedeutung. Damit nimmt die Erregerdiagnostik in diesem wachsenden Patientenkollektiv eine wichtige Schlüsselposition ein. Allerdings erhalten Patienten nach allo-SZT standardmäßig eine prophylaktische Kombination verschiedener antimikrobieller Substanzen. Der herkömmliche Erregernachweis mittels Blutkulturen gestaltet sich unter bereits begonnener Therapie schwierig und erfordert einen relativ großen Zeitaufwand. Somit rücken PCR-basierte Methoden zunehmend in den Vordergrund. Da bei septischem Krankheitsbild zahlreiche Erreger in Betracht gezogen werden müssen, sind vor allem sogenannte Multiplex-PCR-Verfahren, wie der LightCycler® SeptiFast Test der Firma Roche, von Interesse. Erste Untersuchungen dieses Testverfahrens in der Gruppe der hämatologisch-onkologischen Patienten liegen bereits vor. Eine Evaluation des SF-Testes bei Patienten mit hämatologisch-onkologischer Grunderkrankung nach allo-SZT wurde bisher allerdings noch nicht in größerem Umfang vorgenommen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die prospektive Evaluation des SF-Testes hinsichtlich seiner diagnostischen Sensitivität und Spezifität sowie der positiven und negativen Vorhersagewerte im Vergleich zur konventionellen Diagnostik mittels Blutkulturen bei sequentiell und standardisiert behandelten Patienten mit hämatologisch-onkologischer Grunderkrankung nach allo-SZT. Zusätzlich sollte das Testsystem im Hinblick auf die Detektion von Pilzen mit der bereits etablierten pilzspezifischen PCR nach Schabereiter et al. (Inhouse-Methode) verglichen werden.

3 Material

Neben EDTA-Vollblut als biologisches Material wurden die unter Tab. 2 – 5 aufgeführten Materialien verwendet.

Tab. 2: Geräte, Verbrauchsmaterialien und sonstiges Zubehör

Gerät/ Material/ Zubehör	Bestellnummer	Bezugsfirma
Bioshere [®] Filter Tips 100-1000 µl	70762211	Sarstedt, Nümbrecht
Bioshere [®] Filter Tips 200 µl	70760211	Sarstedt, Nümbrecht
Blood tube Rotator SB2		Bibby Scientific, Stone, UK
Capping tool	03357317001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Eismaschine Scotman AF-10	3006ES1L	Fa. Scotman, Schottland
Eppendorf Research Pipette (variabel), 0,1-0,25µl, 0,5-10 µl, 100-1000 µl, 20-200 µl, 10-100 µl		Eppendorf, Hamburg
Filter Tip 10 µl	771265	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Filter Tips 100 µl	772288	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Finnpipette 5-40 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl		VWR, Darmstadt
Hybridisierungsinkubator 7601		GFL [®] , Burgwedel
LC Carousel Centrifuge 2.0	03709582001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler 1.5		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler 2.0	03531414001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Sample Carousel (20 + 100 µl)	03603962001 + 03603954001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler [®] 2.0 Analysesystem mit Software 4.1	03531414001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler [®] Kapillaren 20 µl	0360392001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LightCycler® Kapillaren M ^{GRADE} (100 µl)	03612066001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® Multicolor Compensation Set	04484355001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Lyser	03358976001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR-Arbeitsplatz CleneCab		Herolab, Wiesloch
Polypropylen-Röhrchen 15 ml Falcon TM	352096	BD (Becton Dickinson GmbH), Heidelberg
Reaktionsgefäß 1,5 ml und 0,5 ml	0030.120.086 0030.121.023	Eppendorf, Hamburg
Roche Molecular Biochemicals LightCycler-Software Version 3.52		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Schüttler MTS2		IKA [®] -Werke GmbH & Co.KG, Staufen
SeptiFast Kühlblock	04555864001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SeptiFast Software Set 2.0	05164443001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Sterilwerkbank LaminAir [®] HB 2448		Heraeus Instruments, Hanau
Thermomixer 5436		Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Capsule PMC-060		Tomy Tec, USA
Transferpipette 3,5 ml	86.1171.001	Sarstedt, Nümbrecht
Vortex-Genie 2		Electro Scientific Industries GmbH, München
Zentrifuge Mikro 220 R		Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Rotina 420 R		Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Tab. 3: Anwendungssysteme (Kits)

Kit	Bestellnummer	Bezugsfirma
High Pure PCR Template Preparation Kit	11796828001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I	03515885001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® SeptiFast Kit M ^{GRADE}	04469046001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SeptiFast Prep Kit M ^{GRADE}	04404459001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SeptiFast-Lys Kit M ^{GRADE}	04404432001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tab. 4: Puffer

Puffer	Bestellnummer	Bezugsfirma
Red Cell Lysis Buffer (RCLB):		
- TRIS pH 7,6 10 mM	T-8524	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
- MgCl ₂ 5 mM	M-8266	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
- NaCl 10 mM	1.06404.(1000)	Merck, Darmstadt
- Aqua	2351744	B/Braun, Melsungen
White Cell Lysis Buffer (WCLB):		
- TRIS pH 7,6 10 mM	T-8524	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
- EDTA pH 8,0 10 mM	E-5134	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen
- NaCl 50 mM	1.06404.(1000)	Merck, Darmstadt
- SDS 0,2 %	13760.(1000)	Merck, Darmstadt
- Proteinase K 200 µg/ml	1.24568.(0100)	Merck, Darmstadt

Tab. 5: Reagenzien und Kontrollen

Reagenz/ Kontrolle	Bestellnummer	Bezugsfirma
2-Propanol	1.09634.2500	Merck, Darmstadt
Aspergillus Mix		Fa. TIB Molbiol, Berlin [Schabereiter-Gurtner et al. 2007]
Candida Mix		Fa. TIB Molbiol, Berlin [Schabereiter-Gurtner et al. 2007]
DNA-Away	X996.1	Roth, Karlsruhe
Glass beads, acid-washed 710-1,180 µm (aliquotiert in 2 ml Reaktionsgefäße)	G1152-100G	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen
Kontrollen: - DSM 790 <i>A. fumigatus</i> - ATCC 90028 <i>C. albicans</i>		DSMZ, Braunschweig
MgCl ₂ 50 mM	M-8266	Sigma-Aldrich [®] , Taufkirchen

4 Patientenmanagement

4.1 Patientenrekrutierung

Nach Antragstellung und Zustimmung durch die Ethikkommission der Charité konnte mit der Rekrutierung geeigneter Patienten zur Durchführung dieser prospektiven, nicht-interventionellen, diagnostischen Studie begonnen werden. Eingeschlossen wurden alle erwachsenen Patienten mit hämatologisch-onkologischer Grunderkrankung, die sich im Zeitraum von März 2011 bis März 2012 zur Durchführung einer allo-SZT auf der KMT-Station der Charité, Campus Virchow Klinikum, befunden haben. Nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung konnten insgesamt 104 Patienten für die Studie gewonnen werden (Charakteristika der Patienten: siehe Kapitel 6.1).

4.2 Antimikrobielle Prophylaxe

Während des stationären Aufenthaltes erhielten alle Patienten eine antimikrobielle Prophylaxe. In Anlehnung an Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Infektionen (AGIHO) der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) [Krüger et al. 2005] beinhaltete diese typischerweise Ciprofloxacin zur antibiotischen Prophylaxe, Aciclovir zur Prophylaxe einer Herpesinfektion, die Inhalation von Pentamidin zur Prophylaxe einer Infektion durch *Pneumocystis jirovecii* sowie die orale Therapie mit Amphomoronol-Suspension zur Prophylaxe einer Candidamykose. Beim Vorliegen einer invasiven Mykose in der Vorgeschichte wurde zusätzlich ein systemisches Antimykotikum, meist Voriconazol (n = 32), verabreicht. Wiesen die Patienten Toxoplasma-IgG-Antikörper auf, erfolgte die prophylaktische Gabe von Cotrimoxazol (n = 68). Bei Anzeichen für eine Infektion wurde die antibiotische Therapie in der Regel zunächst auf Piperacillin/ Tazobactam und bei Persistenz des Fiebers nach 72 bis 96 Stunden auf Meropenem +/- Vancomycin umgestellt. Ein Antimykotikum wurde bei antibiotikarefraktärem Fieber oder Verdacht auf eine Pilzinfektion in der Bildgebung hinzugefügt.

4.3 Konditionierung vor allo-SZT

Patienten bis zum 50. Lebensjahr erhielten eine myeloablative Konditionierung bestehend aus einer Ganzkörperbestrahlung mit 12 Gy und Cyclophosphamid (120 mg/kg). Bei Patienten über dem 50. Lebensjahr wurde eine Konditionierung mit reduzierter Intensität, bestehend aus Busul-

fan (2x4 mg/kg), Fludarabin (6x30 mg/m²) und ATG (Anti-Thymozyten-Globulin, 3x10 mg/kg) durchgeführt. Über 70-jährige Patienten erhielten, neben einer Ganzkörperbestrahlung mit 2 Gy, Fludarabin (4x30 mg/kg) und ATG (3x10 mg/kg).

4.4 Probengewinnung

Das Monitoring der Patienten auf Infektionen durch Bakterien und Pilze mittels PCR aus dem Blut erforderte für den SF-Test ein EDTA-Probenvolumen von 1,5 ml (+ 1,5 ml als Reserve); für die pilzspezifische PCR nach Schabereiter et al. (im Folgenden als Inhouse-Methode bezeichnet) ein Probenvolumen von 3 ml (+ 3 ml als Reserve). Die insgesamt 9 ml Vollblut wurden simultan zu standardmäßig durchgeführten Blutentnahmen, sprich bei Aufnahme, einmal wöchentlich und beim Auftreten von Fieber, durch Punktion einer peripheren Vene gewonnen. Im Falle von Fieber wurden zudem routinemäßig Blutkulturen abgenommen.

5 Methoden

5.1 Mikrobiologischer Erregernachweis

Sämtliche abgenommene Blutproben wurden mit dem SF-Test untersucht und die gewonnenen Ergebnisse mit denen der Blutkulturen als Goldstandard des konventionellen Erregernachweises verglichen.

Zusätzlich wurden alle abgenommenen Blutproben mit der Inhouse-Methode (IH-Methode) auf das Vorhandensein von Pilzen untersucht. Die Ergebnisse von SF-Test und IH-Methode im Hinblick auf die Pilzdetektion wurden indirekt anhand der Übereinstimmung mit den EORTC-MSG-Kriterien (die Kriterien werden unter 5.2.3 näher erläutert) miteinander verglichen.

5.1.1 Blutkulturen

Für den kulturellen Erregernachweis wurden zwei bis drei Blutkulturpaare à 20 ml, bestehend jeweils aus einer aeroben und einer anaeroben Kulturflasche, abgenommen und untersucht. Die Analyse erfolgte im mikrobiologischen Labor der Charité – Campus Benjamin Franklin in Berlin unter Verwendung des automatischen Blutkultursystems BACTEC 9240 der Fa. Becton Dickinson. Nach Detektion eines Erregerwachstums erfolgten zunächst eine Präklassifizierung mittels Gramfärbung und anschließend die Anlegung einer Subkultur in einem geeigneten Kulturmedium. Im nächsten Schritt wurden die angezüchteten Erreger identifiziert und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen geprüft.

5.1.2 LightCycler® SeptiFast Test

Der SF-Test (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zur Detektion und Identifikation sowohl bakterieller als auch fungaler DNS bestand aus drei Schritten. Zuerst erfolgte die DNS-Extraktion aus EDTA-Vollblut, dann die Amplifikation und Detektion der extrahierten DNS mittels Multiplex „Real-Time“ PCR im LightCycler 2.0 und zuletzt die softwaregestützte automatische Identifizierung der Erreger. Pro Anwendung des SeptiFast-Testsystems war die Untersuchung eines Probenaufkommens von acht Proben und einer Negativkontrolle möglich. Insgesamt war mit einem Zeitaufwand von ca. 6 Stunden zu rechnen.

5.1.2.1 Extraktion bakterieller und fungaler DNS aus EDTA-Blut

Sämtliche Schritte der Extraktion von bakterieller und fungaler DNS aus EDTA-Vollblut (1500 µl pro Probe) mit dem SF-Test fanden zwecks Kontaminationsprophylaxe unter der Sterilwerkbank LaminAir HBB 2448 der Firma Heraeus Instruments statt, welche vorbereitend mit UV-Licht bestrahlt und flächendesinfiziert wurde. Den Angaben des Herstellers entsprechend erfolgte zunächst die mechanische Lyse des Blutes mit dem SeptiFast Lys Kit im MagNALyser System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die weitere Aufbereitung der Proben erfolgte mittels Reagenzien aus dem SeptiFast Prep Kit M^{GRADE} (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). 1000 µl des entstandenen Lysates wurden mit 150 µl Proteinase K zur DNS-Freisetzung, einem chaotropischen Lysepuffer (LB) zum Schutz der freigesetzten DNS, und 10 µl einer „Internen Kontrolle“ (IC) für 15 Minuten bei 56 °C inkubiert. Bei der IC handelt es sich um synthetisch hergestellte doppelsträngige DNS-Moleküle, die aufgrund entsprechender Primer-Bindungsstellen ebenfalls amplifiziert werden. Die IC kontrolliert die Isolierung von Nukleinsäuren und gibt Aufschluss über eine mögliche Inhibierung sowie eine Mitamplifikation nicht-spezifischer Organismen. Nach Inkubation und Zugabe eines Bindungspuffers wurde das Stoffgemisch im Anschluss in eine Filtersäule mit Glasfaser-Filtereinsatz pipettiert und für insgesamt vier Minuten bei 2850 U/min zentrifugiert um eine Bindung der humanen genomischen und bakteriellen sowie fungalen DNS an die Oberfläche der Glasfaser zu bewirken. Nach zweimaliger Waschung mit „Inhibitor-Removal“-Puffer (IRB) bzw. Waschpuffer zur Entfernung ungebundener Substanzen und Zentrifugation für 2 bzw. 10 Minuten bei 4230 U/min, sowie einem weiteren Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 4230 U/min, erfolgte die Eluierung der gebundenen DNS mittels 320 µl des auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffers. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 4230 U/min konnte das Eluat dann der PCR-Analyse zugeführt werden. Eine schematische Darstellung des beschriebenen Ablaufes zur Extraktion bakterieller und fungaler DNS aus EDTA-Blut mittels SF-Test findet sich in Abb. 7.

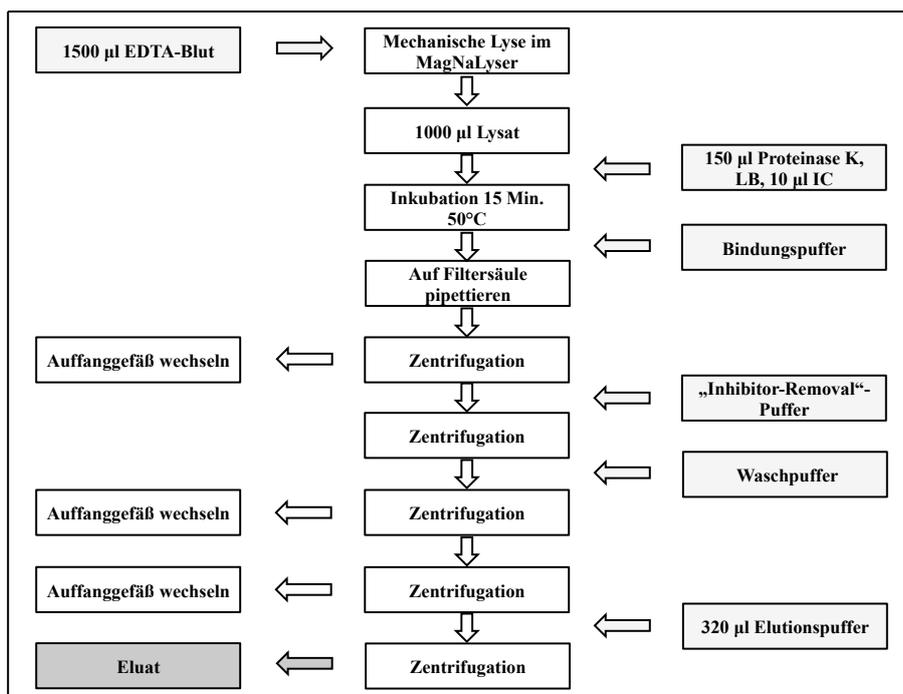


Abb. 7: Schema der DNS-Extraktion mittels SF-Test

5.1.2.2 Amplifikation und Detektion mittels Multiplex „Real-Time“ PCR

Die Amplifikation der DNS von grampositiven Bakterien, gramnegativen Bakterien und Pilzen erforderte drei parallele Reaktionen und damit drei verschiedene PCR-Ansätze. Diese wurden unter Verwendung des LightCycler® SeptiFast Kits M^{Grade} (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) am PCR-Arbeitsplatz CleneCab der Firma Herolab im SeptiFast Kühlblock hergestellt. Abb. 8 veranschaulicht den Aufbau in schematischer Form.

Entsprechend den Herstellerangaben wurden zunächst 600 µl des Reaktionsmixes 1b (< 0,1 % dNTP, < 0,1 % Magnesiumlösung, < 1 % Brij) mit dem Reaktionsmix 1a (3 U/µl FastStart Taq-Polymerase, < 0,1 % AmpErase-Enzym) vermengt und dann jeweils 200 µl dieses Gemisches in die bereitstehenden Detektionsmische für grampositive und gramnegative Bakterien sowie für Pilze pipettiert. Anschließend konnten 100 µl fassende LightCycler® Kapillaren (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) mit jeweils 50 µl eines der drei Master Mixe und 50 µl der extrahierten DNS befüllt werden. Im Kit bereitgestellt wurden darüber hinaus Negativkontrollen und Reagenzkontrollen für grampositive und gramnegative Bakterien sowie für Pilze (enthalten jeweils ein Gemisch aus Zielsequenzen).

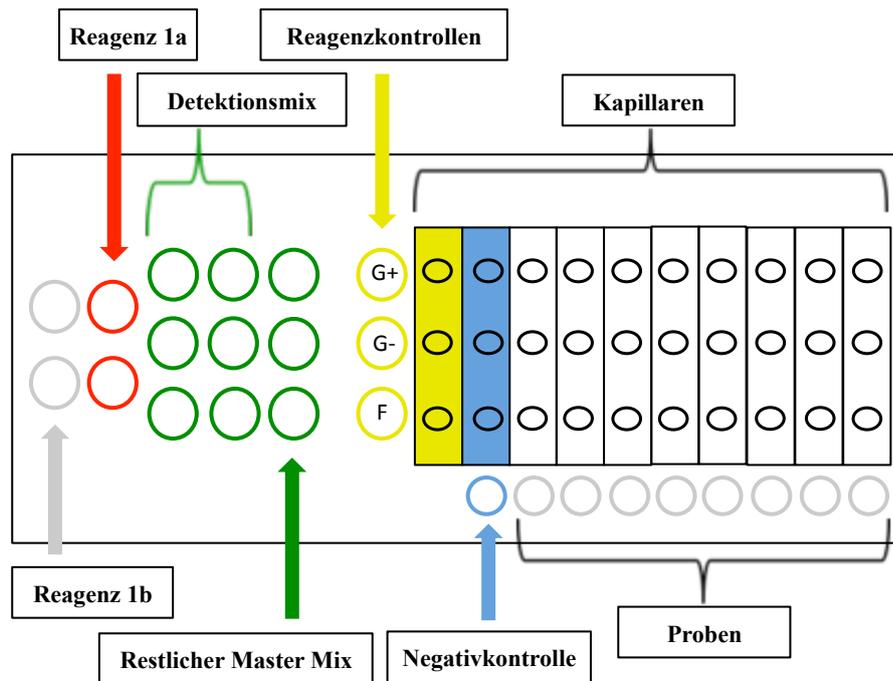


Abb. 8: SeptiFast Kühlblock [modifiziert aus: Roche Diagnostics GmbH, Protocol LightCycler® SeptiFast Test Version 1_DE, S.11]

Die Amplifikation erfolgte im LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Das Amplifikationsschema ist in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Schema der Amplifikation (SF-Test) [nach Lehmann et al. 2008, S. 315]

	Temperatur (°C)	Zeit
Präkonditionierung		
Dekontamination*	40	5 Min.
Enzym-Aktivierung	95	10 Min.
Präamplifikation: 15 Zyklen		
Denaturierung	95	15 Sek.
Annealing	58	50 Sek.
Elongation	72	40 Sek.
Amplifikation: 30 Zyklen		
Denaturierung	95	15 Sek.
Annealing	50	50 Sek.
Elongation	72	40 Sek.

* durch das Enzym AmpErase (Uracyl-N-Glykosylase)

Als Zielsequenz wurde die ITS-Region gewählt. Diese sehr sensitive Region befindet sich bei Bakterien zwischen den 16S- und 23S-Sequenzen ribosomaler DNS, bei Pilzen zwischen den 18S- und 5,8S-Sequenzen und ist gut geeignet, um zwischen den einzelnen Spezies zu differenzieren. Die Amplifikation der speziesspezifischen Zielsequenzen erfolgte durch universelle oder spezifische Primer. Zur Detektion im „Real-Time“ Format wurden fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden eingesetzt. Nach Anlagerung der Sonden in der Annealing-Phase konnte die emittierte Fluoreszenz in einem der vier Detektionskanäle gemessen werden. Im Anschluss an die Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Tab. 7).

Tab. 7: Schema der Schmelzkurvenanalyse (SF-Test) [nach Lehmann et al. 2008, S. 315]

	Temperatur (°C)	Zeit (Sek.)
Denaturierung	95	60
Annealing	40	60
Schmelzen	80	0

Die Abbildungen 9 - 11 geben eine Übersicht über die spezifischen Schmelztemperaturen der PCR-Produkte der verschiedenen Erreger sowie der „Internen Kontrollen“.

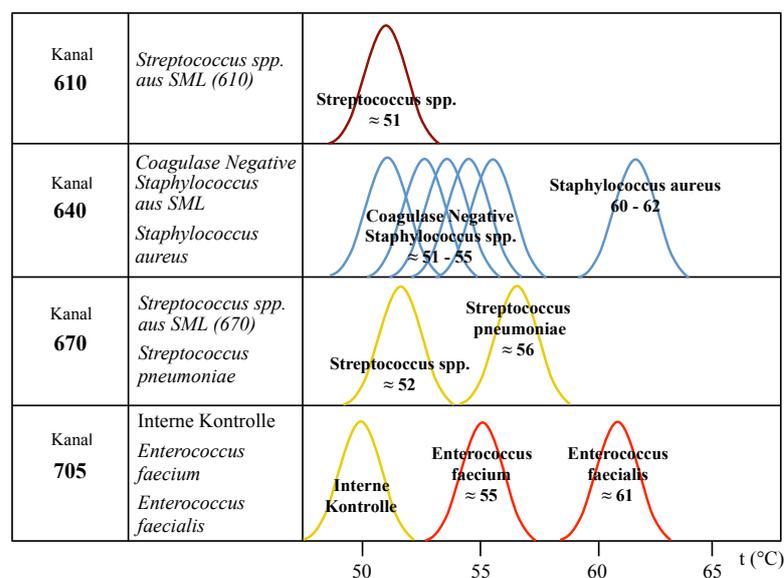


Abb. 9: Schmelztemperaturen der PCR-Produkte grampositiver Bakterien [modifiziert nach Lehmann et al. 2008, S.317]

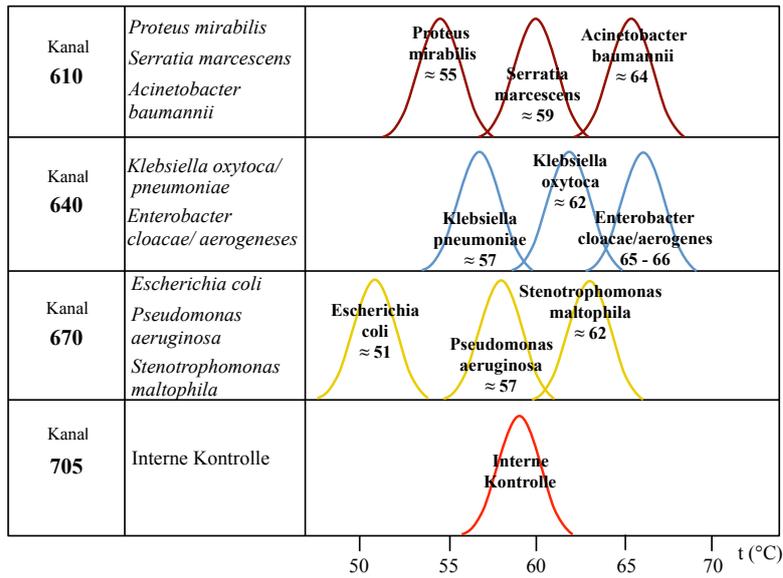


Abb. 10: Schmelztemperaturen der PCR-Produkte gramnegativer Bakterien [modifiziert nach Lehmann et al. 2008, S.317]

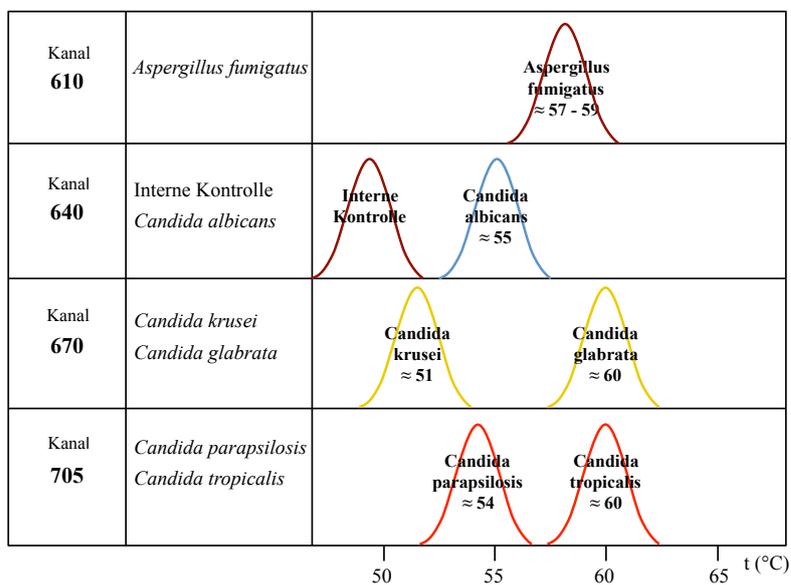


Abb. 11: Schmelztemperaturen der PCR-Produkte der verschiedenen Pilze [modifiziert nach Lehmann et al. 2008, S.317]

5.1.2.3 Automatische Erreger-Identifikation

Zur automatischen Interpretation der Schmelztemperaturen der PCR-Produkte wurde das SeptiFast Software Set 2.0, bestehend aus LightCycler® Software 4.1 und SeptiFast Identification Software 2.0 (SIS; Roche, Mannheim, Deutschland), herangezogen. Hierfür wurden nach Beendigung des PCR-Laufes zunächst alle Schmelzkurvenscheitelpunkte in den verschiedenen Detektionskanälen manuell mit einem vertikalen Schieber markiert und dann softwaregestützt die Schmelztemperaturen (T_m) berechnet.

5.1.3 Inhouse-Methode

Für den Nachweis fungaler DNS wurde eine im Labor bereits etablierte Inhouse-Methode (IH-Methode) gewählt. Die Extraktion der DNS erfolgte aus EDTA-Vollblut nach einem von Schulz et al. modifiziertem Protokoll [Schulz et al. 2009]. Anschließend wurde die extrahierte DNS mittels „Real-Time“ PCR nach Schabereiter-Gurtner et al. im LightCycler 1.5 der Firma Roche amplifiziert und die PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse identifiziert [Schabereiter-Gurtner et al. 2007]. In einem PCR-Lauf konnten maximal 14 Proben analysiert werden. Für Extraktion und PCR war mit einem Zeitaufwand von insgesamt 8 Stunden zu rechnen.

5.1.3.1 Extraktion fungaler DNS aus EDTA-Blut

Um Kontaminationen entgegenzuwirken, wurde auch diese Methode unter der Sterilwerkbank LaminAir HBB 2448 der Firma Heraeus Instruments durchgeführt, welche vorbereitend mit UV-Licht bestrahlt und flächendesinfiziert wurde. Zwei Positivkontrollen (DSM 790 A. *fumigatus*, ATCC 90028 C. *albicans*) und eine Negativkontrolle („Red-Cell-Lysis“-Puffer) wurden in jeder Extraktion mitgeführt. Eingesetzt wurde ein Probenvolumen von je 3 ml EDTA-Blut. Zunächst wurde jede Probe zur hypotonen Lyse der Erythrozyten mit 10 ml „Red-Cell-Lysis“-Puffer (RCLB) versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (10 Minuten bei 3000 U/min), wurde der Überstand entfernt und erneut eine Lyse mit RCLB, inklusive Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation, durchgeführt. Nach Entfernung des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet mit 1 ml „White-Cell-Lysis“-Puffer (WCLB) zur Lyse der Leukozyten resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Proben bei 65°C für 45 Minuten und ein weiterer Zentrifugationschritt (10 Minuten bei 8000 U/min). Der Überstand wurde entfernt und jeder Probe zur mechanischen Lyse weiterer Zellbestandteile 60 – 70 mg Glassbeads zugesetzt. Es folgte ein einmütiges Vortexen und kurzes Anzentrifugieren der Proben. Für die

weitere DNS-Extraktion wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden die Lysate mit 200 μ l „Tissue-Lysis“-Puffer (TLB) und 40 μ l Proteinase K zur DNS-Freisetzung 20 – 30 Minuten bei 55°C inkubiert und im Anschluss anzentrifugiert und mit 200 μ l Bindungspuffer (BB) versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 70°C wurden dem Gemisch 100 μ l Isopropanol zugefügt. Anschließend wurden die Proben auf Filtersäulen pipettiert und für 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert, um eine Bindung der genomischen und fungalen DNS zu erzielen. Ungebundene Substanzen wurden in mehreren Waschschriften entfernt. Nach einmaliger Waschung mit 500 μ l „Inhibitor-Removal“-Puffer (IRB), zweimaliger Waschung mit je 500 μ l Waschpuffer (WB) und jeweils anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 U/min, sowie einem abschließenden Zentrifugationsschritt für 10 Sekunden bei 13000 U/min, wurden die Filtersäulen in sterile Reaktionsgefäße überführt. Es folgte die Eluierung der gebundenen DNS mit 100 μ l Elutionspuffer (EB; vorgewärmt auf 70°C). Das Eluat konnte nach einem letzten Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 8000 U/min der PCR-Analyse zugeführt werden. Eine schematische Darstellung des beschriebenen Ablaufes zur DNS-Extraktion aus EDTA-Blut mittels IH-Methode findet sich in Abb. 12.

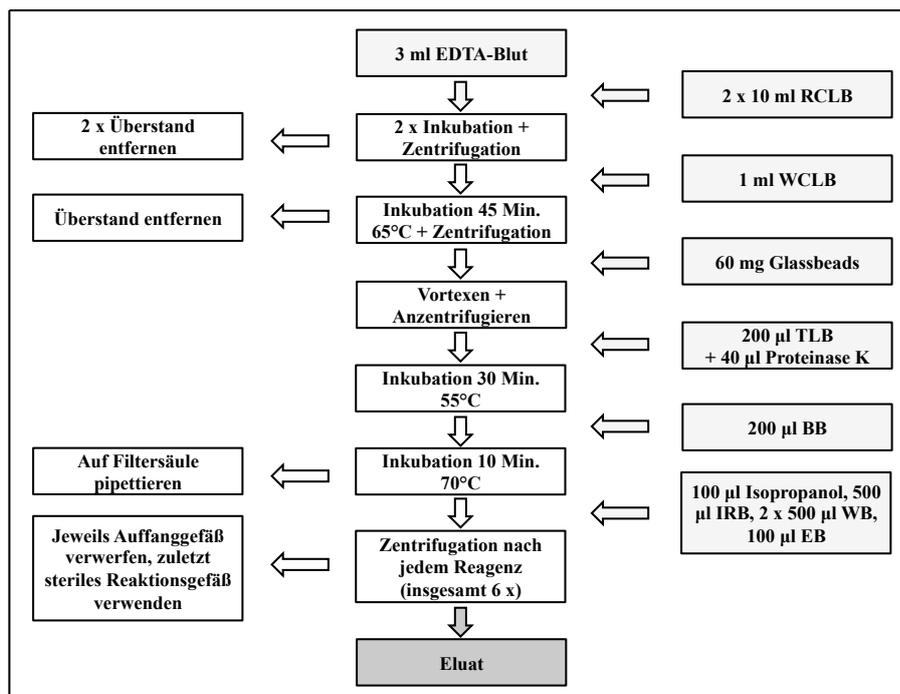


Abb. 12: Schema der DNS-Extraktion mittels IH-Methode

5.1.3.2 „Real-Time“ PCR nach Schabereiter-Gurtner et al.

Schabereiter-Gurtner et al. entwickelten 2007 erstmals ein Protokoll, welches die simultane Detektion und Identifikation von elf verschiedenen Aspergillus- und Candida- Spezies (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*) in nur einem PCR-Lauf ermöglichte [Schabereiter-Gurtner et al. 2007]. Hierfür wurden zwei PCR-Ansätze erstellt, in denen gruppenspezifische und universelle Primer mit fünf Aspergillus- bzw. sechs Candida- spezifischen Sonden kombiniert wurden (Candida-Mix, Aspergillus-Mix). Als Zielsequenz für die gruppenspezifischen Primer (Asp-F und Cand-F) wurde die ITS2-Region gewählt; für die universellen Primer (ITS-R) hoch konservierte Abschnitte des 28S rRNS-Gens. Bei den eingesetzten speziesspezifischen Sonden handelte es sich um sogenannte „Biprobos“, das heißt Cy5 (durch SYBR green I anregbarer Fluoreszenzfarbstoff) -markierte Hybridisierungssonden, die durch Analyse ihrer charakteristischen Schmelztemperaturen eine Identifizierung der elf Aspergillus- und Candida- Spezies ermöglichten. Bezogen auf die vorliegende Arbeit wurden folgende Arbeitsschritte ausgeführt: zunächst wurden beide PCR-Ansätze unter Verwendung von LightCycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) am PCR-Arbeitsplatz CleneCab der Firma Herolab hergestellt. Den Angaben des Herstellers entsprechend, wurden 14 µl der LightCycler® FastStart Enzyme mit dem LightCycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} Reaction Mix (FastStart Taq DNA-Polymerase, Puffer, MgCl₂, SYBR Green I, dNTP) vermengt. Für jede Patientenprobe wurden 4 µl dieses Gemisches in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert und 11,2 µl destilliertes Wassers, 0,8 µl 50 mM Mg und entweder 2 µl des Candida-Mixes oder 2 µl des Aspergillus-Mixes hinzugefügt. Es entstanden also sowohl ein „Master Mix“ mit Candida-Mix als auch einer mit Aspergillus-Mix. In bereitgestellte 20 µl fassende Kapillaren wurden dann 18 µl eines der beiden „Master Mixe“ und 2 µl der extrahierten DNS pipettiert. Daneben wurden auch eine Negativkontrolle (18 µl Master Mix und 2 µl destilliertes Wasser) und eine Positivkontrolle (18 µl Master Mix und 2 µl Aspergillus- bzw. Candida-DNS) für die PCR vorbereitet. Nach kurzer Zentrifugation (2800 U/min) der Kapillaren erfolgte die „Real-Time“ PCR im LightCycler 1.5 der Firma Roche nach dem in Tab. 8 aufgeführten Schema.

Tab. 8: Schema der Amplifikation (IH-Methode) [nach Schabereiter-Gurtner et al. 2007]

	Temperatur (°C)	Zeit
Einleitung		
Denaturierung	95	10 Min.
Amplifikation: 60 Zyklen		
Denaturierung	95	8 Sek.
Annealing	55	10 Sek.
Elongation	72	10 Sek.

Das emittierte Fluoreszenzsignal des interkalierenden Farbstoffes SYBR Green I wurde im F1 Kanal, das Signal der „Biprobos“ im F3 Kanal detektiert.

Tab. 9: Schema der Schmelzkurvenanalyse (IH-Methode) [Schabereiter-Gurtner et al. 2007]

	Temperatur (°C)	Zeit
Denaturierung	95	30 Sek.
Annealing	35	60 sec
Melting	98	0,2°/Sek.

Tab. 10: Charakteristische Schmelztemperaturen [nach Schabereiter-Gurtner et al. 2007]

Spezies	T _m (°C)
<i>A. terreus</i>	57 und 66
<i>A. flavus</i>	59
<i>A. fumigatus</i>	63
<i>A. nidulans</i>	66
<i>A. niger</i>	68
<i>C. albicans</i>	55 bzw. 66
<i>C. parapsilosis</i>	58
<i>C. krusei</i>	60
<i>C. dubliniensis</i>	62
<i>C. tropicalis</i>	63
<i>C. glabrata</i>	65

Im Anschluss an die Amplifikation wurde die Schmelzkurvenanalyse nach dem in Tab. 9 dargestellten Schema durchgeführt. Einen Überblick über die charakteristischen Schmelztemperaturen der einzelnen Spezies gibt Tab 10. Ein finaler Kühlungsschritt (40°C für 10 sec) beendete den PCR-Lauf.

5.2 Grundlegende Definitionen verwendeter Begriffe und Kriterien

5.2.1 Fieber unklarer Ursache bei Patienten mit Granulozytopenie

Nach Angaben der AGIHO wird Fieber unklarer Ursache bei Patienten mit Granulozytopenie wie folgt definiert [Link et al. 2003]: Eine einmalig gemessene Temperatur von $\geq 38,3\text{ C}^\circ$ oder eine über mindestens eine Stunde anhaltende Temperatur von $\geq 38,0\text{ C}^\circ$ oder eine zweimal innerhalb von zwölf Stunden gemessene Temperatur von $\geq 38,0\text{ C}^\circ$ bei Reduktion der neutrophilen Granulozyten auf $< 500\ \mu\text{l}$ oder auf $< 1000\ \mu\text{l}$ mit einem erwarteten Abfall auf $< 500\ \mu\text{l}$.

5.2.2 Sepsis

Nach einem Konsensusbeschluss des „American College of Chest Physicians“ (ACCP) und der „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) aus dem Jahr 1992 ist Sepsis definiert als eine generalisierte inflammatorische Reaktion (SIRS) auf eine Infektion [Bone et al. 1992]. Eine SIRS liegt vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Körpertemperatur $> 38^\circ\text{C}$ oder $< 36^\circ\text{C}$
- Herzfrequenz $> 90/\text{min}$
- Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder $\text{PaCO}_2 < 32\ \text{mmHg}$
- Leukozytenzahlen $> 12000/\text{mm}^3$ oder $< 4000/\text{mm}^3$ oder $> 10\%$ unreife Leukozyten

Bei Patienten in der Granulozytopenie können die Leukozytenzahlen nicht als SIRS- bzw. Sepsis-Kriterium herangezogen werden. Die AGIHO schlägt eine Anpassung der Kriterien vor [Penack et al. 2014]:

- Allgemeine Parameter: Körpertemperatur $> 38,3^\circ\text{C}$ oder $< 36,0^\circ\text{C}$, Herzfrequenz $> 90/\text{min}$, Atemfrequenz $> 30/\text{min}$, Mentale Veränderungen, signifikante Ödeme oder positive Flüssigkeitsbilanz, Plasma-Glukose $> 110\ \text{mg/dl}$ oder $> 7,7\ \text{mmol/l}$ bei Patienten ohne Diabetes
- Inflammatorische Parameter: CRP oder Procalcitonin $> 2\ \text{SD}$ über dem Normwert

- Hämodynamische Parameter: Systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder mittlerer arterieller Druck < 70 mmHg oder systolischer Blutdruckabfall > 40 mmHg
- Parameter der Organdysfunktion: Arterielle Hypoxämie ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$), Urinausscheidung < 0,5 ml/kg/h für ≥ 2 h, Kreatininanstieg $\geq 0,5$ mg/dl, Gerinnungsstörungen (INR > 1,5 oder aPTT > 60 sec), Ileus, Bilirubin > 4 mg/dl oder 70 mmol/l
- Parameter der Gewebsperfusion: Laktat > 3 mmol/l, verminderte Kapillarfüllung oder Marmorierung der Haut

5.2.3 EORTC-MSG-Kriterien

Tab. 11: EORTC-MSG-Kriterien [nach Ruhnke 2011, S. 31, zitiert nach De Pauw et al. 2008]

Kategorie	Kriterien
Gesichert	<p>Histopathologischer, zytopathologischer oder direkter mikroskopischer Pilznachweis in einer durch Feinnadelpunktion oder Biopsie gewonnenen Probe. Fadenpilze: Hyphen oder Pilzzellen mit begleitender Gewebeschädigung Hefepilze: Probe aus primär sterilem Kompartiment mit Nachweis von Hefepilzen</p> <p>Oder kultureller Nachweis in einer steril entnommenen Probe aus einem primär sterilen Kompartiment, das klinisch oder radiologisch als Ort der Infektion ausgewiesen ist (nicht aus bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit, Nasennebenhöhlen-Sekret, Urin)</p> <p>Oder kultureller Nachweis aus Blut im klinischen Kontext eines Infektionsprozesses</p>
Wahrscheinlich	<p>Risikofaktor (neben Granulozytopenie, allogener HSZT, Kortikosteroid-Therapie, Anwendung eines T-Zell-Immunsuppressivums, hereditäre Immundefizienz)</p> <p>Und klinisches Kriterium</p> <p>Lunge (eines der drei Zeichen): dichte, scharf umschriebene Läsion mit oder ohne Halo-Zeichen, Luftsichel-Zeichen, Höhle Tracheobronchitis: bronchoskopisch nachgewiesene Ulzeration, Noduli, Pseudomembran, Plaque oder Schorf Sinunasaler Infekt: Sinusitis (bildgebend) plus eines von drei Zeichen: lokalisierter akuter Schmerz, Nasenulkus mit schwarzem Schorf, Ausbreitung auf parasinusale Knochenstrukturen ZNS (eines der zwei Zeichen): bildgebend fokale Läsion, meningeales Enhancement von Kontrastmittel (Computertomographie, Magnetresonanztomographie) Disseminierte Candidose (eines der zwei Zeichen): kleine zielscheibenartige Läsionen (Bullaugen-Zeichen) in Leber oder Milz, progressive retinale Exsudate</p> <p>Und mykologisches Kriterium (Zytologie, Mikroskopie, kultureller Nachweis) Hefepilze: in Sputum, bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit, bronchiale Bürstung, Nebenhöhlenaspirate (eines der beiden Zeichen): direkter Nachweis, Kulturnachweis Fadenpilze: Kulturnachweis Aspergillose: Galaktomannan-Antigen-Nachweis in Plasma, Serum, bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit oder Liquor Alle invasiven Mykosen außer Kryptokokkose und Zygomycose: β-D-Glukan im Serum</p>
Möglich	<p>Risikofaktor (wie unter „wahrscheinlich“)</p> <p>Und klinisches Kriterium (wie unter „wahrscheinlich“)</p> <p>Bei fehlendem mykologischen Kriterium</p>

In einem überarbeiteten Konsensusbeschluss der „European Organization for Research and Treatment of Cancer“ (EORTC) und der „Mycosis Study Group“ (MSG) aus dem Jahre 2008 wurden die in Tab. 11 aufgeführten Diagnosekriterien definiert, um in klinischen und epidemiologischen Studien die Diagnose einer invasiven Mykose zu stellen. Die Diagnosesicherheit wird dabei in die drei Kategorien „gesichert“, „wahrscheinlich“ und „möglich“ unterteilt [De Pauw et al. 2008]. In der vorliegenden Arbeit wurden die EORTC-MSG-Kriterien als „Goldstandard“ für den Vergleich von SF-Test und IH-Methode im Hinblick auf die Detektion von Pilzinfektionen gewählt.

5.3 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte in einer mittels Microsoft Access (Version 2010, München, Deutschland) erstellten Datenbank. Eingetragen wurden allgemeine Angaben wie Alter, Geschlecht, Haupt- und infektionsbezogene Vorerkrankungen und antimikrobielle Prophylaxe sowie die Ergebnisse der mikrobiologischen Infektionsdiagnostik (SF-Test, IH-Methode und Blutkultur). Darüber hinaus wurden Angaben zu Fieber, Laborwerten (Blutbild, Differential-Blutbild, C-reaktives Protein) und Ergebnisse radiographischer und sonstiger Untersuchungen erfasst.

		GOLDSTANDARD		
		Krankheit liegt vor	Krankheit liegt nicht vor	
NEUES DIAGNOSE-VERFAHREN	Krankheit liegt vor (positives Testergebnis)	richtig positiv a	falsch positiv b	alle Test-Positiven a + b
	Krankheit liegt nicht vor (negatives Testergebnis)	falsch negativ c	richtig negativ d	alle Test-Negativen c + d
		alle Erkrankten a + c	alle Gesunden b + d	alle Untersuchten N

Abb. 13: Vierfeldertafel [modifiziert nach Schwarzer et al. 2002, S.333]

Die Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS für Windows (Version 21, München, Deutschland). Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität sowie der negativen und positiven Vorhersagewerte des SF-Testes wurde mit der Vierfeldertafel gearbeitet (Abb. 13). Als Goldstandard wurden die Ergebnisse der Blutkulturen herangezogen. Für den Vergleich des SF-Testes und der IH-Methode hinsichtlich der Pilzdetektion wurden die EORTC-MSG-Kriterien als Goldstandard verwendet. Dabei wurden die Kategorien „wahrscheinliche Invasive Pilzinfektion (IFD)“ und „gesicherte IFD“ als zutreffend, die Kategorie „mögliche IFD“ in der Berechnung einmal als zutreffend und einmal als unzutreffend gewertet.

Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert berechnen sich wie folgt [Schwarzer et al. 2002, Weiß 2010]:

Sensitivität:

Anteil der richtig als positiv erkannten Ergebnisse von den Ergebnissen aller Erkrankten.

Sensitivität = $a / a + c$ (Anzahl der richtig Positiven/ Anzahl der richtig Positiven + Anzahl der falsch Negativen)

Spezifität:

Anteil der richtig als negativ erkannten Ergebnisse von den Ergebnissen aller Gesunden.

Spezifität = $d / b + d$ (Anzahl der richtig Negativen/ Anzahl der richtig Negativen + Anzahl der falsch Positiven)

Positiver Vorhersagewert (Positiver prädiktiver Wert, PPW):

Anteil der richtig positiven Ergebnisse von den Ergebnissen aller Test-Positiven.

PPW = $a / a + b$ (Anzahl der richtig Positiven/ Anzahl der richtig Positiven + Anzahl der falsch Positiven)

Negativer Vorhersagewert (Negativer prädiktiver Wert, NPW):

Anteil der richtig negativen Ergebnisse von den Ergebnissen aller Test-Negativen.

NPW = $d / c + d$ (Anzahl der richtig Negativen/ Anzahl der richtig Negativen + Anzahl der falsch Negativen)

6 Ergebnisse

6.1 Patientenkollektiv

Es konnten 104 Patienten (57 männlich, 47 weiblich) zwischen dem 19. und 70. Lebensjahr in die vorliegende Studie eingeschlossen werden. Einen Überblick über die Charakteristika der Patienten gibt Tab. 12.

Tab. 12: Merkmale der eingeschlossenen Patienten

Patientenmerkmal	Wert(e)
Mittleres Alter in Jahren (SD;R)	51 (12,27;19-70)
Männer (%)	57 (54,8)
Frauen (%)	47 (45,2)
Mittlere stationäre Aufenthaltsdauer in Tagen (SD;R)	40,9 (12,75;11-85)
Mittlere Anzahl an Blutentnahmen pro Patient (SD;R)	8,1 (3,76;2-22)
Im Krankenhaus verstorbene Patienten (%)	6 (5,8)
Grunderkrankung	
Akute myeloische Leukämie (%)	56 (53,8)
Multiples Myelom (%)	10 (9,6)
Myelodysplastisches Syndrom (%)	7 (6,7)
Myeloproliferatives Syndrom (%)	5 (4,8)
MPS/MDS overlap Syndrom (%)	3 (2,9)
Akute lymphatische Leukämie (%)	12 (11,5)
Non-Hodgkin-Lymphom (%)	8 (7,7)
Myelosarkom (%)	1 (1,0)
Hämophagozytische Lymphohistiozytose (%)	1 (1,0)
X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (%)	1 (1,0)

Während des stationären Aufenthaltes verstarben insgesamt sechs der 104 Patienten (5,8 %) im Rahmen eines Multiorganversagen (Sepsis: n = 2, Virusinfektion: n = 2, toxisch bedingtes Multiorganversagen: n = 1, Venoocclusive Erkrankung: n = 1).

6.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Diagnostik

Innerhalb des einjährigen Evaluierungszeitraumes wurden insgesamt 205 Blutkulturen (BK) analysiert sowie 847 Blutproben mittels LightCycler® SeptiFast Test (SF-Test) und ebenfalls 847 Blutproben mittels Inhouse-Methode (IH-Methode) untersucht.

6.2.1 Blutkulturen

6.2.1.1 Ergebnisse der Blutkulturen

Während des stationären Aufenthaltes entwickelten 69 der insgesamt 104 eingeschlossenen Patienten (66,3 %) mindestens einmalig Fieber mit konsekutiver Abnahme von Blutkulturen (insgesamt n = 205). Während der Fieberepisoden wurden 198 Blutkulturen (BK) und nach abgeklungenem Fieber sieben Kulturen als Kontrollen entnommen (Tab. 13).

Tab. 13: Ergebnisse der Blutkulturen (BK)

	BK negativ	BK positiv	Gesamt
Fieberproben	160	38	198
Routineproben	7	0	7
Gesamt	167	38	205

Alle sieben Kontroll-BK fielen negativ aus. Ein Erregernachweis gelang in 38 der insgesamt 198 bei Fieber abgenommenen BK (19,2 %). 21 der 198 bei Fieber abgenommenen BK (10,6 %) fielen negativ aus, im weiteren Verlauf der Fieberepisode konnten allerdings (unabhängig von dieser Studie) Erreger mittels BK gesichert werden. Vier BK-negative Episoden (2 %) zeigten Erregernachweise in Trachealsekret (n = 2), Urin (n = 1) und Stuhl (n = 1). Bei 65 der 198 bei Fieber abgenommenen BK (32,8 %) bestanden klinisch ein Infektionsfokus (n = 63) oder eine Sepsis (n = 2) ohne mikrobiologische Erregersicherung. Eine grafische Übersicht über die BK-Ergebnisse unter Berücksichtigung des klinischen Befundbildes gibt Abb. 14.

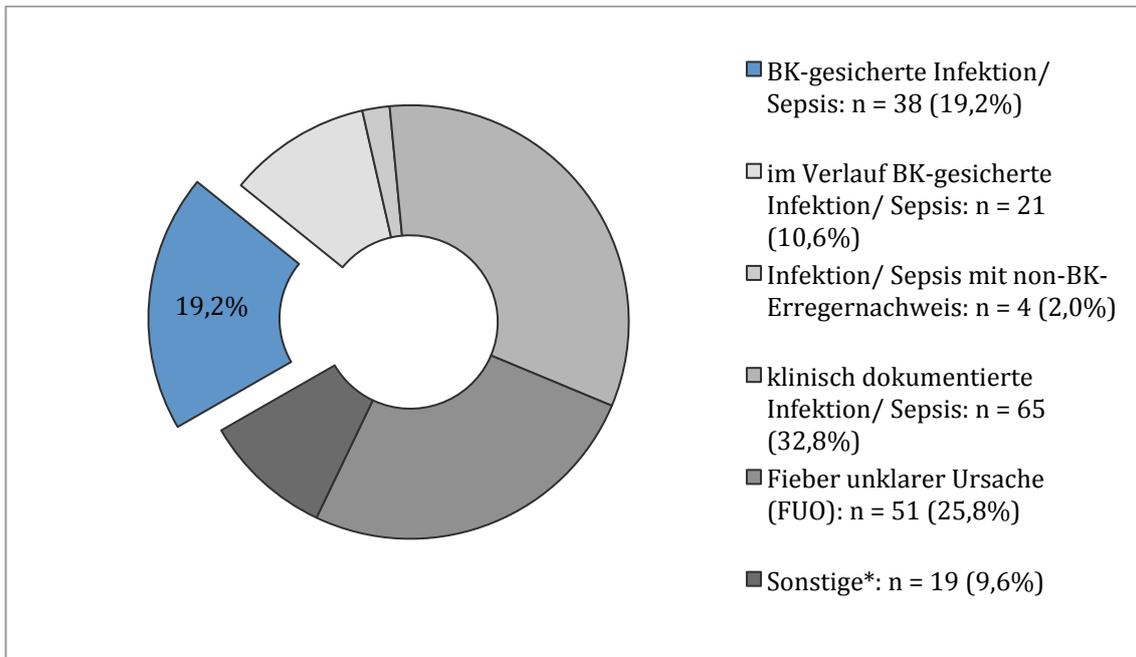


Abb. 14: Auftreten von Fieber: BK-Ergebnisse und Klinik

*Sonstige: Allergische Reaktion (n=1), Fieber unter Konditionierung mit ATG (n=5), CMV-Reaktivierung (n=2), „Graft-versus-Host-Disease“ (n=8), lokale ESBL-Besiedelung (n=3)

6.2.1.2 Nachgewiesene Erreger

In den 38 positiven BK konnten insgesamt 40 Erreger nachgewiesen werden (Tab. 14). Bei 16 Patienten wurden *Coagulase negative Staphylococci (CoNS)* nachgewiesen. Klinisch imponierte in dieser Gruppe fünfmal das Bild einer katheterassoziierten Sepsis, zweimal das Bild einer Sepsis ohne eindeutigen Fokus, dreimal eine Katheterinfektion, viermal eine Bakteriämie bei Fieber in der Phase der Granulozytopenie und einmal zeigte sich radiologisch eine Pilzinfektion. Ein Patient hatte mit einem Abstand von zehn Tagen zwei verschiedene Fieberepisoden; einmal unter dem Bild einer katheterassoziierten Sepsis (kulturell zweimal positiver *CoNS*-Nachweis) und einmal als Pneumonie in der Bildgebung (kulturell ebenfalls zweimal positiver *CoNS*-Nachweis). Zwei andere Patienten mit katheterassoziiierter Sepsis bzw. Sepsis hatten je dreimal positive BK's für *CoNS*. Bei acht weiteren Patienten konnten jeweils zweimalig *CoNS* nachgewiesen werden.

Mit Ausnahme von *Clostridium ramosum* (Klinik: Fieber in der Phase der Granulozytopenie) wurden die übrigen in Tab. 10 aufgeführten Erreger bei Patienten mit Sepsis detektiert.

In zwei Fällen wurde eine Mischinfektion durch zwei Erreger nachgewiesen (*Enterobacter cloacae* + *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus faecium* + *Staphylococcus hämolyticus*). Beide Patienten hatten eine (katheterassoziierte) Sepsis.

Tab. 14: Mittels Blutkultur identifizierte Erreger

	N Erreger	N Patienten
<i>Coagulase negative Staphylococci</i>	29	16
(<i>S.epidermidis</i>)	(17)	
(<i>S.hämolyticus</i>)	(10)	
(<i>S.epidermidis</i> + <i>S.hämolyticus</i>)	(2)	
<i>Streptococcus mitis</i>	1	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1
<i>Escherichia coli</i>	6	6
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1
<i>Clostridium ramosum</i>	1	1
Gesamt	40	27

6.2.2 LightCycler® SeptiFast Test

6.2.2.1 Ergebnisse des LightCycler® SeptiFast Tests (SF-Test)

Von den insgesamt 847 abgenommenen Blutproben wurden 225 Proben (26,6 %) während Fieber und 622 Proben (73,4 %) im Rahmen des wöchentlichen Monitoring mit dem SF-Test auf das Vorhandensein von bakteriellen und fungalen Erregern untersucht (Tab. 15). Bei Fieber zeigten 59 Proben (26,2 %), im Rahmen der routinemäßigen Kontrolluntersuchungen 32 Proben (5,1 %) ein positives Ergebnis.

Tab. 15: Ergebnisse des SF-Tests

	SF-Test negativ	SF-Test positiv	Gesamt
Fieberproben	166	59	225
Routineproben	590	32	622
Gesamt	756	91	847

Tab. 16 stellt die Ergebnisse der drei parallel ablaufenden Reaktionen im SF-Test zur DNS-Detektion grampositiver, gramnegativer und fungaler Erreger dar. Grampositive Erreger konnten

in 53 Proben (mit Nachweis von insgesamt 55 grampositiven Bakterien), gramnegative Erreger in 18 Proben (mit Nachweis von insgesamt 25 gramnegativen Bakterien) und Pilze in 30 Proben (mit Nachweis von insgesamt 30 Pilzen) identifiziert werden.

Tab. 16: Detektion von grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie von Pilzen

	Grampositiv (%)	Gramnegativ (%)	Fungi (%)
Negativ	789 (93,2)	790 (93,3)	801 (94,6)
Positiv	53 (6,3)	18 (2,1)	30 (3,5)
IC* nicht detektiert	5 (0,6)	39 (4,6)	16 (1,9)
Gesamt	847 (100,0)	847 (100,0)	847 (100,0)

*IC = Interne Kontrolle

In zwei Proben wurden je zwei grampositive Erreger detektiert (jeweils *Enterococcus faecium* + *CoNS*). Beide Patienten hatten eine Sepsis mit Nachweis von *Enterococcus faecium* + *CoNS* bzw. *CoNS* in der BK.

Sechs Proben von fünf Patienten waren positiv für mindestens zwei gramnegative Bakterien: Der erste Patient war positiv für *Klebsiella oxytoca* + *Klebsiella pneumoniae* (Klinik: Fieber und bekannte ESBL-Besiedelung), der zweite Patient mit Nachweis der gleichen Erregerkonstellation in zwei aufeinander folgenden Blutproben wies ein Fieber unklarer Ursache auf. Zudem wurde in einer der beiden Proben zusätzlich *Staphylococcus aureus* detektiert. Die letzten drei der fünf Patienten hatten positive Routineproben mit polymikrobiellem Erregernachweis ohne klinische Symptome (1. *Enterobacter cloacae* + *Klebsiella pneumoniae* + *Pseudomonas aeruginosa*, 2. *Enterobacter cloacae* + *Pseudomonas aeruginosa*, 3. *Enterobacter cloacae* + *Enterobacter aerogenes*).

In allen 30 Proben mit Pilznachweis wurde je Probe immer nur ein fungaler Erreger identifiziert. In zehn Proben (ausschließlich Fieberproben) wurden grampositive und gramnegative Bakterien (n = 3) bzw. Bakterien und Pilze (n = 7) simultan detektiert: In sechs Proben des Patienten „DC81“ konnten sowohl *CoNS* als auch *Candida albicans* nachgewiesen werden. Klinisch bestand eine katheterassoziierte Sepsis mit Nachweis von *CoNS* in der Blutkultur. Im Verlauf zeigten sich darüber hinaus pulmonale Infiltrate in der Bildgebung. „DC81“ war zudem am Anfang dieser Fieberepisode einmalig positiv für *CoNS* und *Escherichia coli*. Der Patient „DW101“ zeigte in einer Probe simultan eine Positivität für *CoNS* und *Aspergillus fumigatus*. Hier wurde

klinisch, neben einer katheterassoziierten Sepsis mit kulturellem Nachweis von *CoNS*, der radiologische Verdacht auf eine invasive pulmonale Aspergillose (IPA) geäußert. Bei zwei weiteren Patienten konnten *Escherichia coli* + *CoNS* (Klinik: Sepsis mit *Escherichia coli*- Nachweis in der BK) bzw. *Klebsiella oxytoca/pneumoniae* + *Staphylococcus aureus* (Klinik: Fieber unklarer Ursache) nachgewiesen werden.

Die Detektion der grampositiven „Internen Kontrolle“ (IC) misslang zunächst in 12 PCR-Läufen. Nach Laufwiederholung konnte die Kontrolle weiterhin in fünf Fällen nicht nachgewiesen werden. Analog wurden primär 56 gramnegative und 45 fungale IC nicht detektiert; bei Laufwiederholung gelang die Detektion von 39 gramnegativen und 16 fungalen IC nicht.

6.2.2.2 Nachgewiesene Erreger bei Fieber

Im Einzelnen wurden mit dem SF-Test bei Fieber die in Tab. 17 aufgeführten Erreger identifiziert.

Tab. 17: Mittels SF-Test nachgewiesene Erreger bei Fieber

	N Erreger	N Patienten
<i>Coagulase negative Staphylococci</i>	30	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	1
<i>Enterococcus faecium</i>	3	2
<i>Enterococcus faecialis</i>	2	1
<i>Escherichia coli</i>	7	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8	3
<i>Candida albicans</i>	14	3
Gesamt	74	37

Bei 14 Patienten wurden in insgesamt 30 Proben *CoNS* detektiert. Klinisch wiesen die Patienten eine Sepsis (n = 8), pulmonale Infiltrate in der Bildgebung (n = 1), eine Mukositis (n = 1), Fieber unklarer Ursache (n = 3) und ein Multiorganversagen (n = 1) auf. *Staphylococcus aureus* wurde

in zwei Fällen nachgewiesen (Klinik: einmal FUO, einmal Pilzpneumonie in der Bildgebung). *Streptococcus pneumoniae* (1 Patient), *Enterococcus faecium* (2 Patienten) und *Stenotrophomonas maltophilia* (1 Patient) wurden jeweils bei Sepsis detektiert. *Enterococcus faecialis* wurde in zwei Proben eines Patienten mit fraglich beginnenden pulmonalen Infiltraten in der Bildgebung identifiziert. Sechs Patienten waren positiv für *Escherichia coli*. Klinisch zeigten die Patienten eine Sepsis (n = 5) und eine Pneumonie in der Bildgebung (n = 1). *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella pneumoniae* wurden simultan bei zwei Patienten mit FUO bzw. lokaler ESBL-Besiedelung der Haut nachgewiesen.

Ein Pilznachweis gelang bei sechs Patienten. Drei dieser Patienten („AW23“, „DW101“, „CA53“) waren positiv für *Aspergillus fumigatus*. „AW23“ wurde in fünf Fieberproben positiv getestet. Neben radiologischen Kriterien für eine Pilzpneumonie wurden Aspergillusantigene im Blut nachgewiesen (Galactomannan-Test). Bei „DW101“ (1 positive Probe) und „CA53“ (2 positive Proben) wurde bildgebend der Verdacht auf eine invasive pulmonale Aspergillose bzw. eine Pneumonie geäußert. *Candida albicans* wurde ebenfalls bei drei Patienten („DC81“, „CX76“, „CZ78“) nachgewiesen, wobei „DC81“ in elf Fieberproben positiv getestet wurde. In sechs dieser Proben konnten zusätzlich *CoNS* identifiziert werden. Klinisch wies „DC81“ eine katheterassoziierte Sepsis und im weiteren Verlauf fragliche beginnende pulmonale Infiltrate in der Bildgebung auf. „CX76“ war zweimal positiv für *Candida albicans*. Radiologisch bestand der Verdacht auf eine invasive pulmonale Aspergillose; der Galactomannan-Test war positiv. „CZ78“ mit einmaligem *Candida albicans*-Nachweis wies klinisch eine Katheterinfektion auf.

6.2.2.3 Nachgewiesene Erreger während des Monitoring

Tab. 18 zeigt die mit dem SF-Test im Rahmen des Monitoring in Routineproben nachgewiesenen Erreger. In 32 routinemäßig abgenommene Blutproben von 30 verschiedenen Patienten konnten insgesamt 36 Erreger nachgewiesen werden. Bei zwölf der Patienten mit positivem SF-Testergebnis in den Routineproben zeigten sich im engen zeitlichen Verhältnis Symptome einer Infektion. Sechs der zwölf Patienten waren im SF-Test positiv für *CoNS* und entwickelten wenige Tage vor bzw. nach der Blutentnahme Fieber oder eine Sepsis (2 x mit *CoNS*-Nachweis in der BK) bzw. pulmonale Infiltrate in der Bildgebung. Der siebte Patient („DC81“) mit zahlreichen positiven Testungen auf *CoNS* (und *Candida albicans*, s.o.) während Fieber hatte zudem einmalig ein positives SF-Testergebnis für *CoNS* im fieberfreien Intervall. Der achte Patient mit zweimaligem Nachweis von *Enterococcus faecium* wies wenige Tage später eine Sepsis (BK: *Enterococcus faecium*) auf. *Escherichia coli* wurde bei dem neunten der zwölf Patienten in einer

Routineprobe nachgewiesen. Einen Tag zuvor hatte dieser Fieber und auch die BK war positiv für *Escherichia coli*. Der zehnte Patient zeigte klinisch ein Leber- und Nierenversagen bei venookklusiver Erkrankung mit Todesfolge. Hier wurden *Escherichia coli* und *Enterococcus faecium*, in jeweils getrennten Proben, identifiziert. Der elfte Patient („AW23“) mit Pilzpneumonie in der Bildgebung, positivem Galactomannan-Test und Detektion von *Aspergillus fumigatus* mittels SF-Test in mehreren Fieberproben (s.o.) wies zudem vier positive Routineproben für diesen Erreger auf. *Candida albicans* wurde während des Monitorings bei dem zwölften Patienten („CX76“) nachgewiesen, der zu diesem Zeitpunkt eine Mukositis mit Nachweis von *Candida albicans* im Rachenabstrich aufwies und mehrere Tage nach Abnahme der Routineprobe Fieber mit Anhalt für eine invasive pulmonale Aspergillose in Bildgebung und Blut entwickelte (s.o.).

Tab. 18: Mittels SF-Test nachgewiesene Erreger im Rahmen des Monitorings

	N Erreger	N Patienten
<i>Coagulase negative Staphylococci</i>	11	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3
<i>Enterococcus faecium</i>	3	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1
<i>Escherichia coli</i>	2	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	1
<i>Candida albicans</i>	3	3
<i>Candida krusei</i>	1	1
Gesamt	36	30

6.2.3 Inhouse-Methode

6.2.3.1 Ergebnisse der Inhouse-Methode

Auch mit der IH-Methode wurden 225 (26,6 %) der insgesamt 847 abgenommenen Blutproben während Fieber und 622 Proben (73,4 %) im Rahmen des wöchentlichen Monitoring auf das Vorhandensein von Pilzen untersucht (Tab. 19).

Tab. 19: Ergebnisse der IH-Methode

	IH-Methode negativ	IH-Methode positiv	Gesamt
Fieberproben	217	8	225
Routineproben	573	49	622
Gesamt	790	57	847

Insgesamt zeigten 57 (6,7 %) Proben positive Ergebnisse (acht positive Proben bei Fieber, 49 positive Routineproben während des Monitoring).

6.2.3.2 Nachgewiesene Erreger bei Fieber

Im Einzelnen wurden mit der IH-Methode die in Tab. 20 aufgeführten Pilze bei Fieber identifiziert.

Tab. 20: Mittels IH-Methode nachgewiesene Erreger bei Fieber

	N Erreger	N Patienten
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1
<i>Aspergillus terreus</i>	2	2
<i>Candida albicans</i>	5	4
Gesamt	8	7

Auch mittels IH-Methode wurde bei dem Patienten „AW23“ *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen (Klinik: Pilzpneumonie in der Bildgebung, positiver Galactomannan-Test).

Aspergillus terreus konnte bei zwei Patienten identifiziert werden. Der eine Patient zeigte ein FUO, der andere eine Katheterinfektion.

Bei vier Patienten wurden in insgesamt fünf Proben *Candida albicans* detektiert. Klinisch wiesen die Patienten eine katheterassoziierte Sepsis mit beginnenden pulmonalen Infiltrate in der Bildgebung (n = 1; Patient „DC81“), ein FUO (n = 2) und eine möglich invasive Aspergillose (n = 1; Patient „DW101“) auf.

6.2.3.3 Nachgewiesene Erreger während des Monitoring

Tab. 21 zeigt die mittels IH-Methode im Rahmen des Monitoring in Routineproben nachgewiesenen Pilze.

Tab. 21: Mittels IH-Methode nachgewiesene Erreger im Rahmen des Monitoring

	N Erreger	N Patienten
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	2
<i>Aspergillus terreus</i>	24	23
<i>Candida albicans</i>	19	17
<i>Candida dubliniensis</i>	2	2
<i>Candida parapsilosis</i>	5	5
Gesamt	52	49

In 49 routinemäßig abgenommene Blutproben von 49 verschiedenen Patienten konnten insgesamt 52 Erreger nachgewiesen werden. In drei Proben wurden mehr als ein Erreger nachgewiesen (zwei Proben mit Nachweis von *Candida albicans* und *Candida parapsilosis*, eine Probe mit Nachweis von *Aspergillus terreus* und *Candida parapsilosis*). In keinem dieser drei Fälle bestand eine klinische Symptomatik.

Elf Patienten mit positivem Ergebnis in den Routineproben wiesen klinisch Symptome einer Infektion auf: Ein Patient mit *Aspergillus fumigatus* - Nachweis zeigte radiologisch fraglich beginnende pulmonale Infiltrate. *Aspergillus terreus* wurde bei drei Patienten detektiert, die klinisch Lungeninfiltrate in der Bildgebung, eine Mukositis und eine CMV-Reaktivierung aufwiesen. Sechs Patienten hatten ein positives Ergebnis für *Candida albicans* und zeigten klinisch pulmonale Infiltrate (n = 3), eine Mukositis (n = 1), ein seborrhoisches/mykotisches Hautekzem (n = 1)

sowie in Folge ein FUO (n = 1). Der 11. Patient („BX50“) wurde mittels IH-Methode im Rahmen des Monitoring positiv auf *Candida dubliniensis* getestet. Radiologisch wurde hier der Verdacht auf eine Pilzpneumonie geäußert.

Alle übrigen Erreger, darunter auch *Aspergillus terreus* mit weiteren 21 positiven Proben (neben den oben bereits genannten vier positiven Proben), wurden ohne Anhaltspunkte für eine klinische Symptomatik nachgewiesen.

6.3 LightCycler® SeptiFast Test im Vergleich zur Blutkultur

6.3.1 Vergleich der identifizierten Erreger

In 205 Fällen (198 Fieberproben, 7 Routineproben) wurden sowohl Blutkulturen abgenommen als auch der SF-Test durchgeführt. Insgesamt konnten 74 Erreger mittels PCR und/ oder BK nachgewiesen werden. Das Venn-Diagramm (Abb. 15) stellt die Verteilung des Erregernachweises auf die beiden Methoden dar.

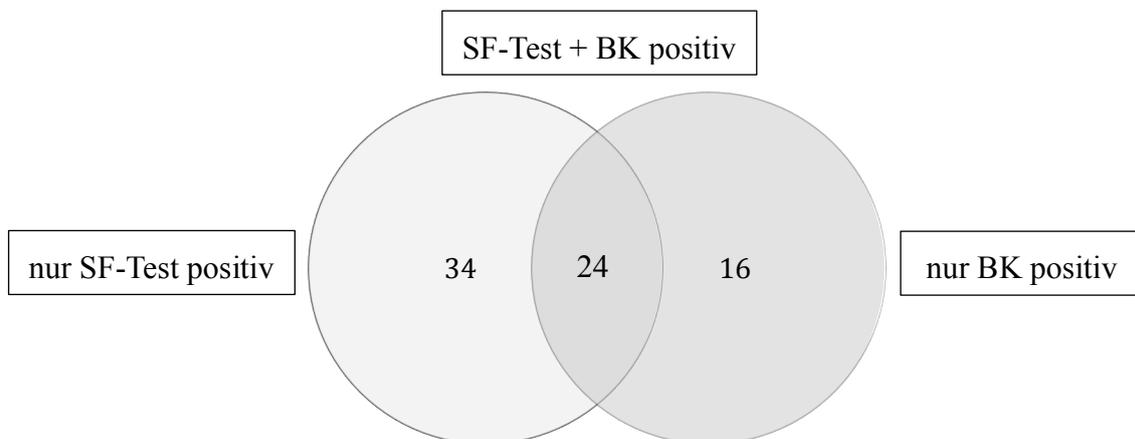


Abb. 15 Anzahl der Erreger, die mittels SF-Test und/ oder BK detektiert wurden

Tab. 22 zeigt, welche Erreger durch beide Methoden („SF-Test + BK“) oder nur durch eine der beiden Methoden („nur SF-Test“; „nur BK“) detektiert wurden. Die in Klammern stehenden *Streptococcus mitis* und *Clostridium ramosum* sind nicht im Detektionspanel des SF-Tests enthalten.

Tab. 22: Vergleich der mittels SF-Test und BK identifizierten Erreger

	SF-Test + BK	nur SF-Test	nur BK
<i>Coagulase negative Staphylococci</i>	18	8	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	2	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	1	0
(<i>Streptococcus mitis</i>)*	0	0	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	0
<i>Enterococcus faecialis</i>	0	2	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	1
<i>Escherichia coli</i>	4	1	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	2	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	2	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	0
(<i>Clostridium ramosum</i>)*	0	0	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	5	0
<i>Candida albicans</i>	0	9	0
Gesamt	24	34	16

*nicht im Detektionspanel des SF-Tests enthalten

Insgesamt zeigten SF-Test und BK beim Nachweis von 24 Erregern (in 23 Proben) ein kongruent positives Ergebnis. Übereinstimmend wurden die Spezies *CoNS* (n = 18), *Enterococcus faecium* (n = 1), *Escherichia coli* (n = 4) und *Stenotrophomonas maltophilia* (n = 1) detektiert. In einer Probe wurden mittels beider Methoden gleichzeitig *CoNS* und *Enterococcus faecium* nachgewiesen.

Neben den Pilzen *Aspergillus fumigatus* (n = 5) und *Candida albicans* (n = 9) wurden 20 bakterielle Erreger nur im SF-Test und nicht in der BK detektiert. In fünf Fällen (4 x *CoNS*, 1 x *Escherichia coli*) waren kurze Zeit vorher auch die Blutkulturen positiv. Wie bereits die zuvor genannten Erreger, stammten auch alle weiteren 15 Bakterien, die nur im SF-Test nachgewiesen wurden, aus bei Fieber abgenommenen Blutproben (3 x *CoNS* bei Mukositis, FUO und Multiorganversagen; 2 x *Staphylococcus aureus* bei FUO bzw. Pilzpneumonie in der Bildgebung; 2 x *Enterococcus faecium* bei Sepsis, 2 x *Enterococcus faecialis* bei einem Patienten mit pulmonalen

Infiltraten, 2 x *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella pneumoniae* bei FUO bzw. einem Patienten mit lokaler ESBL-Besiedelung der Haut; vgl. auch Kapitel 4.2.2.2).

Nur in den BK und nicht im SF-Test wurden 16 Erreger nachgewiesen. Die Patienten zeigten klinisch eine Sepsis mit Nachweis von *CoNS* (n = 3), *Escherichia coli* (n = 2), *Enterobacter cloacae* (n = 1) und *Streptococcus mitis* (n = 1), eine Katheterinfektion mit Nachweis von *CoNS* (n = 3), ein FUO mit Nachweis von *CoNS* (n = 4) bzw. *Clostridium ramosum* (n = 1) sowie eine radiologisch diagnostizierte Pilzpneumonie mit Nachweis von *CoNS* (n = 1).

In zwei, im Rahmen einer Sepsis abgenommenen Blutproben, wurden mit dem SF-Test und der BK unterschiedliche Erreger detektiert: In einer Probe mit Nachweis von *Enterobacter cloacae* und *CoNS* in der BK wurden im SF-Test nur *CoNS* identifiziert; in einer weiteren Probe mit Nachweis von *Streptococcus mitis* in der BK war der SF-Test positiv für *Streptococcus pneumoniae*. Ferner wurde im SF-Test bei dem Patienten „DC81“ *Candida albicans* nachgewiesen, während die BK positiv für *CoNS* war.

6.3.2 Übereinstimmungsrate, Validität und Vorhersagewerte

Die nachfolgende Vierfeldertafel (Tab. 23) gibt die Anzahl der mittels einer bzw. beider Methoden positiv bzw. negativ getesteten Proben wieder. Wegen fehlender Vergleichbarkeit wurden drei Fälle aus der Betrachtung ausgeschlossen (1. Fall: Nachweis von *Streptococcus pneumoniae* im SF-Test und *Streptococcus mitis* in der BK. 2. Fall: *Candida albicans* im SF-Test und *CoNS* in der BK. 3. Fall: *Clostridium ramosum* in der BK; dieser Erreger ist im SF-Test-Panel nicht enthalten). Somit wurden insgesamt 202 Fälle gewertet.

Tab. 23: Vierfeldertafel SF-Test/ BK

	BK positiv	BK negativ	Gesamt
SF-Test positiv	23	22	45
SF-Test negativ	12	145	157
Gesamt	35	167	202

In 23 Proben (mit Nachweis von 24 Erregern) haben der SF-Test und die BK identische Erreger identifiziert. Ein simultan negatives Ergebnis wurde in 145 Proben erbracht. Somit ergibt sich in 83,2 % der Fälle ein übereinstimmendes Ergebnis von SF-Test und BK.

Die BK sind komplett negativ hinsichtlich der Pilzdetektion ausgefallen. Werden diejenigen Fälle aus den Berechnungen ausgeschlossen, in denen mittels SF-Test einzig Pilze detektiert wurden (also keine simultane Bakteriendetektion), entfallen acht Fälle (*Candida albicans*: n = 4; *Aspergillus fumigatus*: n = 4). Die verbliebenen 194 für die Bewertung herangezogenen Fälle sind in Tab. 24 aufgeführt.

Tab. 24: Vierfeldertafel SF-Test/ BK unter Ausschluss der Fälle mit Pilzdetektion durch den SF-Test

	BK positiv	BK negativ	Gesamt
SF-Test positiv	23	14	37
SF-Test negativ	12	145	157
Gesamt	35	159	194

Gegenüber der Tab. 23 verändert sich lediglich die Anzahl der im SF-Test „falsch Positiven“ von zuvor 22 auf jetzt 14 Fälle. Die Übereinstimmungsrate beträgt nun 86,6 %.

Gegenüber der BK als Goldstandard in der Erregerdiagnostik, resultieren für den SF-Test die in Tab. 25 dargestellten Werte für Sensitivität, Spezifität, negativem und positivem Vorhersagewert (in Klammern angegeben jeweils das 95 %- Konfidenzintervall).

Tab. 25: Validität und Vorhersagewerte des SF-Tests

	Pilze eingeschlossen (vgl. Tab. 23)	Pilze ausgeschlossen (vgl. Tab. 24)
Sensitivität (95%-KI*)	0,66 (0,50 – 0,82)	0,66 (0,50 – 0,82)
Spezifität (95%-KI)	0,87 (0,82 – 0,92)	0,91 (0,87 – 0,95)
PPV (95%-KI)	0,51 (0,36 – 0,66)	0,62 (0,45 – 0,79)
NPV (95%-KI)	0,92 (0,88 – 0,96)	0,92 (0,88 – 0,96)

*KI = Konfidenzintervall

6.4 LightCycler® SeptiFast Test im Vergleich zur Inhouse-Methode

6.4.1 Vergleich der identifizierten Pilze bei Fieber

Bei Fieber wurden 225 Blutproben sowohl mit dem SF-Test als auch mittels IH-Methode auf das Vorhandensein von Pilzen untersucht. Insgesamt konnten 28 Pilze mittels SF-Test und/ oder IH-

Methode nachgewiesen werden. Das Venn-Diagramm (Abb. 16) stellt die Verteilung der nachgewiesenen Pilze auf die beiden Methoden dar.

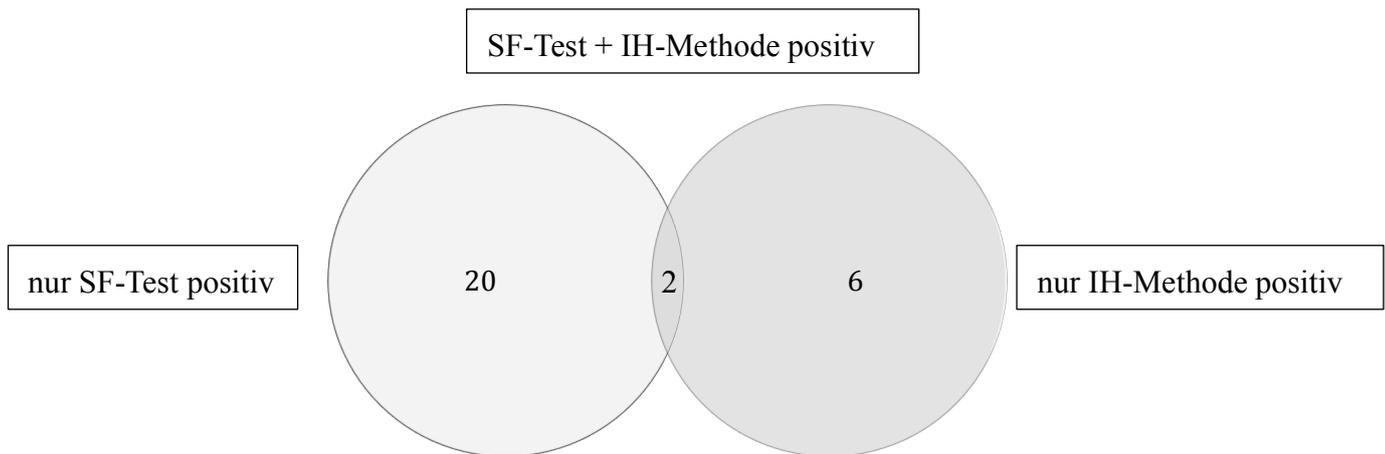


Abb. 16: Anzahl der Erreger, die mittels SF-Test und/ oder IH-Methode detektiert wurden

Tab. 26 zeigt, welche Erreger durch beide Methoden („SF-Test + IH-Methode“) oder nur durch eine der beiden Methoden („nur SF-Test“; „nur IH-Methode“) detektiert wurden. Der in Klammern stehende *Aspergillus terreus* ist nicht im Detektionspanel des SF-Tests enthalten.

Tab. 26: Vergleich der identifizierten Pilze im SF-Test und der IH-Methode bei Fieber

	SF-Test + IH-Methode	nur SF-Test	nur IH-Methode
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	7	0
(<i>Aspergillus terreus</i>)*	0	0	2
<i>Candida albicans</i>	1	13	4
Gesamt	2	20	6

*nicht im Detektionspanel des SF-Tests enthalten

SF-Test und IH-Methode zeigten in zwei Fällen ein kongruent positives Ergebnis. Beide Methoden wiesen *Aspergillus fumigatus* bei dem Patienten „AW23“ mit wahrscheinlicher invasiver pulmonaler Aspergillose nach. Des Weiteren wurde *Candida albicans* einmalig simultan sowohl mit der IH-Methode als auch mit dem SF-Test bei dem Patienten „DC81“ nachgewiesen, der klinischerseits eine katheterassoziierte Sepsis (*CoNS* in der BK) und im Verlauf pulmonale Infil-

rate in der Bildgebung zeigte. „DC81“ wurde über einen Zeitraum von knapp sechs Wochen insgesamt elfmal im SF-Test (ausschließlich Fieberproben) und zweimal mit der IH-Methode (1 x Fieberprobe, 1 x Routineprobe) positiv auf *Candida albicans* getestet.

6.4.2 Vergleich der identifizierten Pilze im Rahmen der Routinekontrollen

Im Rahmen der Routinekontrollen wurden 622 Blutproben sowohl mit dem SF-Test als auch mittels IH-Methode auf das Vorhandensein von Pilzen untersucht (siehe Tab. 27). Die in Klammern aufgeführten Pilze (*Aspergillus terreus* und *Candida dubliniensis*) lassen sich nicht mit dem SF-Test nachweisen.

Insgesamt wurden 60 Pilze durch den SF-Test (n = 8) oder die IH-Methode (n = 58) nachgewiesen. Ein kongruent positives Ergebnis lag nicht vor. Bezüglich der klinischen Symptome bei Erregernachweis mittels nur einer der beiden Methoden wird auf 6.2.2.3 und 6.2.3.3 verwiesen.

Tab. 27: Vergleich der identifizierten Pilze im SF-Test und der IH-Methode in den Routineproben

	SF-Test + IH-Methode	Nur SF-Test	Nur IH-Methode
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	4	2
(<i>Aspergillus terreus</i>)*	0	0	24
<i>Candida albicans</i>	0	3	19
<i>Candida krusei</i>	0	1	0
(<i>Candida dubliniensis</i>)*	0	0	2
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	5
Gesamt	0	8	52

*nicht im Detektionspanel des SF-Tests enthalten

6.4.3 Übereinstimmungsrate, Validität und Vorhersagewerte

SF-Test und IH-Methode wurden jeweils im Vergleich mit den EORTC-MSG-Kriterien (als gewählter Goldstandard der Pilzdiagnostik) evaluiert.

6.4.3.1 Anhand der EORTC-MSG-Kriterien identifizierte invasive Mykosen

Anhand der EORTC-MSG-Kriterien konnte bei insgesamt 15 Patienten (6,9 %) die Diagnose einer „wahrscheinlichen“ (n = 2) oder „möglichen“ (n = 13) invasiven Mykose (IFD) gestellt werden (Tab. 28). Beide „wahrscheinlichen“ IFD wurden, bei positivem Galactomannan-Test (mykologisches Kriterium) und entsprechendem bildgebendem Befund (klinisches Kriterium), als invasive pulmonale Aspergillosen (IPA) eingeordnet. Die Einordnung der „möglichen“ IFD wurden anhand des CT-morphologischen Befundes (klinisches Kriterium) bei fehlendem mykologischem Kriterium vorgenommen.

Tab. 28: Patienten mit invasiver Mykose (nach EORTC-MSG-Kriterien)

Patient	Geschlecht	Alter	Grunderkrankung	Kategorie	SF-Test	IH-Methode
AW23	m	65	MPS	wahrscheinlich	<i>A.fumigatus</i>	<i>A.fumigatus</i>
CX76	w	45	ALL	wahrscheinlich	<i>C.albicans</i>	negativ
DW101	w	64	Multipl. Myelom	möglich	<i>A.fumigatus</i>	<i>C.albicans</i>
BB28	m	31	AML	möglich	<i>C.albicans</i>	<i>A.terreus</i>
BX50	m	28	AML	möglich	negativ	<i>C.dublinsiensis</i>
DH86	w	45	AML	möglich	negativ	<i>C.albicans</i>
BR44	m	53	Myelosarkom	möglich	negativ	<i>C.parapsilosis</i>
AZ26	w	45	AML	möglich	negativ	negativ
AY25	w	48	AML	möglich	negativ	negativ
AK11	m	25	AML	möglich	negativ	negativ
CI61	m	30	NHL	möglich	negativ	negativ
DU99	w	30	AML	möglich	negativ	negativ
DS97	m	33	X-chrom. Adrenoleukodystrophie	möglich	negativ	negativ
AH8	w	45	CML	möglich	negativ	negativ
AB2	w	56	AML	möglich	negativ	negativ

„AW23“, einer der beiden Patienten mit „wahrscheinlicher“ invasiver pulmonaler Aspergillose (IPA), zeigte im SF-Test in insgesamt neun Blutproben ein positives Ergebnis für *Aspergillus fumigatus*. Auch mit der IH-Methode wurde einmalig *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen. Bei „CX76“, dem zweiten Patienten mit „wahrscheinlicher“ IPA, war der SF-Test in zwei Blutproben positiv für *Candida albicans*. Im Rahmen der „möglichen“ invasiven Mykosen konnte der SF-

Test bei einem Patienten („DW101“) *Aspergillus fumigatus* und bei einem anderen Patienten („BB28“) *Candida albicans* nachweisen. Bei „BB28“ war eine *Candida albicans*- assoziierte Hautmykose bekannt. Alle mittels IH-Methode bei „möglicher“ invasiver Mykose nachgewiesenen Erreger, wiesen einen „Crossing point“ von > 56 auf.

6.4.3.2 Übereinstimmung von SF-Test und EORTC-MSG-Kriterien

Die nachfolgenden Vierfeldertafeln (Tab. 29 und Tab. 30) ordnen die mittels SF-Test positiv und negativ getesteten Proben den Ergebnissen der EORTC-MSG-Kriterien bzgl. des Vorliegens einer IFD zu. Die „möglichen“ IFD wurden dabei einmal in die Gruppe der tatsächlichen „IFD“ (Kalkulation A: Tab. 29) und einmal in die Gruppe „Keine IFD“ (Kalkulation B: Tab. 30) eingeordnet.

In beiden Kalkulationen wurden 826 Proben bewertet. Ausgeschlossen wurden 21 Proben von drei Patienten: Die beiden Patienten „DC81“ (11 x *Candida albicans* im SF und 2 x in der IH-Methode) und „CA53“ (2 x *Aspergillus fumigatus* im SF-Test) konnten in keine der drei EORTC-MSG-Kategorien eingeordnet werden (Ausschluss von 14 bzw. fünf in diese Episode gehörigen Blutprobenergebnissen). Der Patient „CX76“ wies laut EORTC-MSG-Kriterien eine wahrscheinliche invasive Aspergillose auf, im SF-Test wurde aber *Candida albicans* nachgewiesen (Ausschluss von zwei Proben).

Tab. 29: Vierfeldertafel SF-Test/ IFD nach EORTC-MSG-Kriterien
(Kalkulation A: mögliche IFD = IFD)

	IFD	Keine IFD	Gesamt
SF-Test positiv	11	4	15
SF-Test negativ	97	714	811
Gesamt	108	718	826

Unter Berücksichtigung der Kalkulation A zeigte der SF-Test im Vergleich zu den EORTC-MSG-Kriterien in elf Proben ein korrekt positives und in 714 Proben ein korrekt negatives Ergebnis, entsprechend einer Übereinstimmungsrate von 87,8 %.

Tab. 30: Vierfeldertafel SF-Test/ IFD nach EORTC-MSG-Kriterien
(Kalkulation B: mögliche IFD = keine IFD)

	IFD	Keine IFD	Gesamt
SF-Test positiv	9	6	15
SF-Test negativ	14	797	811
Gesamt	23	803	826

Wird die Kalkulation B berücksichtigt, zeigte der SF-Test in neun Proben ein korrekt positives und in 797 Proben ein korrekt negatives Ergebnis, entsprechend einer Übereinstimmungsrate von 97,6 %.

6.4.3.3 Übereinstimmung von IH-Methode und EORTC-MSG-Kriterien

Auch die Ergebnisse der IH-Methode wurden mit denen der EORTC-MSG-Kriterien verglichen. Analog zur Einordnung des SF-Tests (siehe Kapitel 6.4.3.2) wurden die „möglichen“ IFD dabei einmal in die Gruppe der tatsächlichen „IFD“ (Kalkulation A: Tab. 31) und einmal in die Gruppe „Keine IFD“ (Kalkulation B: Tab. 32) eingeordnet.

Tab. 31: Vierfeldertafel IH-Methode/ IFD nach EORTC-MSG-Kriterien
(Kalkulation A: mögliche IFD = IFD)

	IFD	Keine IFD	Gesamt
IH-Methode positiv	7	47	54
IH-Methode negativ	101	671	772
Gesamt	108	718	826

Unter Berücksichtigung der Kalkulation A zeigte die IH-Methode im Vergleich zu den EORTC-MSG-Kriterien in sieben Proben ein korrekt positives und in 671 Proben ein korrekt negatives Ergebnis, entsprechend einer Übereinstimmungsrate von 82,1 %.

Tab. 32: Vierfeldertafel IH-Methode/ IFD nach EORTC-MSG-Kriterien
(Kalkulation B: mögliche IFD = keine IFD)

	IFD	Keine IFD	Gesamt
IH-Methode positiv	1	53	54
IH-Methode negativ	22	750	772
Gesamt	23	803	826

Wird die Kalkulation B berücksichtigt, zeigte die IH-Methode in einer Probe ein korrekt positives und in 750 Proben ein korrekt negatives Ergebnis, entsprechend einer Übereinstimmungsrate von 90,9 %.

6.4.3.4 Vergleich von SF-Test und IH-Methode

Validität und Vorhersagewerte von SF-Test und IH-Methode werden in Tab. 33 vergleichend dargestellt. Dabei werden beide geschilderten Kalkulationen („Kalkulation A“: mögliche IFD = tatsächliche IFD und „Kalkulation B“: mögliche IFD = keine tatsächliche IFD) betrachtet. Die Werte für Sensitivität, Spezifität, negativen und positiven Vorhersagewert resultieren jeweils aus dem Vergleich mit den nach EORTC-MSG-Kriterien erhobenen Ergebnissen.

Tab. 33: Validität und Vorhersagewerte von SF-Test und IH-Methode

	Mögliche IFD = tatsächliche IFD		Mögliche IFD = keine tatsächliche IFD	
	SF-Test	IH-Methode	SF-Test	IH-Methode
Sensitivität (95%-KI)	0,102 (0,054-0,168)	0,065 (0,028-0,122)	0,391 (0,211-0,594)	0,043 (0,003-0,178)
Spezifität (95%-KI)	0,994 (0,987-0,998)	0,935 (0,915-0,952)	0,993 (0,985-0,997)	0,934 (0,915-0,950)
PPV (95%-KI)	0,733 (0,485-0,908)	0,096 (0,058-0,236)	0,600 (0,351-0,817)	0,019 (0,001-0,079)
NPV (95%-KI)	0,880 (0,857-0,902)	0,869 (0,844-0,892)	0,983 (0,972-0,990)	0,972 (0,958-0,982)

7 Diskussion

Infektionen stellen eine gefürchtete Komplikation nach allo-SZT bei Patienten mit hämatologisch-onkologischen Grunderkrankungen dar. Laut einer Übersichtsarbeit von Nesher und Rolston aus dem Jahr 2014 sind etwa 50 % der Fieberepisoden von Patienten in der Phase der Granulozytopenie infektiös bedingt. Eine kulturelle Sicherung des infektionsauslösenden Erregers gelingt allerdings nur in 20 – 25 %; das heißt, in etwa der Hälfte der Fälle lässt sich eine Infektion, trotz klinischem Fokus, nicht mikrobiell hinterlegen [Nesher und Rolston 2014].

Mit dem LightCycler® SeptiFast Test der Firma Roche ist seit 2005 ein Multiplex-PCR-Verfahren zum direkten Nachweis der 25 häufigsten Sepsiserreger aus dem Vollblut kommerziell erhältlich. Ziel dieser Studie war die prospektive Evaluation des SF-Tests bei hämatologisch-onkologischen Patienten nach allo-SZT im Vergleich zur Blutkultur und im Vergleich zu einer pilzspezifischen Inhouse-PCR-Methode.

7.1 Diskussion der Ergebnisse der einzelnen mikrobiologischen Nachweisverfahren

7.1.1 Blutkulturen

Blutkulturen stellen den Goldstandard des Erregernachweises aus dem Blut dar. In der vorliegenden Untersuchung konnten mittels BK in 19,2 % der Blutproben, die bei Fieber entnommen wurden, Erreger detektiert werden. Überwiegend wurden grampositive Bakterien nachgewiesen, wobei mit Abstand am häufigsten *CoNS* detektiert werden. Die Ergebnisse untermauern die Entwicklung der letzten Jahre. Oppenheim gibt in seiner Übersichtsarbeit aus dem Jahre 1998 die Ergebnisse der „International Antimicrobial Therapy Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer“ (EORTC) von 1973 bis 1994 wieder. Hier konnte eine Verlagerung des infektionsauslösenden Spektrums bei Patienten mit Fieber in der Granulozytopenie von vorwiegend gramnegativen Bakterien (70% der bakteriellen Infektionen in 1973 - 1976) hin zu grampositiven Bakterien (70 % der bakteriellen Infektionen in 1993 – 1994) demonstriert werden. Als einer der möglichen Gründe wird der weit verbreitete Gebrauch zentraler Venenkatheter mit konsekutivem Anstieg von Infektionen durch Erreger der Hautflora, wie z.B. *CoNS*, angegeben [Oppenheim 1998]. Da *CoNS* der Hautflora angehören, ist die Einordnung einer positiven BK als echte Bakteriämie vs. Kontamination allerdings schwierig. In einer aktuellen Studie wurden 162 Patienten mit *CoNS*-Nachweis in der BK untersucht. 24 Patienten (14,8 %) hatten letztlich eine echte Bakteriämie, bei 138 Patienten (85,2 %) wurde der *CoNS*-Nachweis als Kontamination gewertet [Karakullukcu et al. 2017]. Beekmann et al. untersuchten

405 *CoNS*-positive BK. In 22 % der Fälle wurde der *CoNS*-Nachweis einer echten Bakteriämie zugeordnet; 78 % wurden als Kontamination gewertet. Es wird allerdings darauf hingewiesen, dass echte Bakteriämien durch *CoNS* signifikant öfter bei Patienten mit Granulozytopenie auftreten [Beekmann et al. 2005].

Auch in einer Untersuchung von Klustersky et al. aus dem Jahr 2007 bestätigt sich der Wandel des mikrobiellen Spektrums. Die Analyse umfasste 499 Patienten mit Bakteriämie bei Fieber im Rahmen einer Chemotherapie-assoziierten Granulozytopenie. In 57 % der Fälle konnten grampositive und in 34 % gramnegative Bakterien nachgewiesen werden. Zu 10 % bestand eine polymikrobielle Bakteriämie. Die Infektionsprophylaxe mit Cotrimoxazol bzw. Fluorchinolonen wurde als einer der Hauptgründe für die Abnahme von Bakteriämien durch gramnegative Erreger angesehen [Klustersky et al. 2007].

Einen erneuten Umschwung des bakteriellen Spektrums von vorwiegend grampositiven zu gramnegativen Erregern beschreiben Montassier et al. in ihrer systemischen Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2013. Hier wird die in einigen medizinischen Einrichtungen beobachtete, abermalige Zunahme der Infektionen durch gramnegative Bakterien mit der Abnahme des Einsatzes einer Fluorchinolon-Prophylaxe (aufgrund zunehmender Resistenzentwicklungen) begründet [Montassier et al. 2013]. Da die in die vorliegende Studie eingeschlossenen Patienten sämtlich unter einer Fluorchinolon-Prophylaxe mit Ciprofloxacin standen, kann dieser neuste Trend hier nicht beobachtet werden.

7.1.2 LightCycler® SeptiFast Test

Der SF-Test wurde in den vergangenen Jahren bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen evaluiert. Vorwiegend wurde das System bei kritisch kranken Patienten mit (vermuteter) Sepsis untersucht. Dabei zeigte der SF-Test in 14 – 40,8 % der analysierten Blutproben ein positives Ergebnis [Vince et al. 2008, Dierkes et al. 2009, Wallet et al. 2009, Westh et al. 2009, Pasqualini et al. 2012, Rath et al. 2012, Leitner et al. 2013, Schreiber et al. 2013, Herne et al. 2013, Sitnik et al. 2014, Tafelski et al. 2015].

Auch einige Studien mit hämatologisch-onkologischen Patienten wurden bereits veröffentlicht. Mancini et al. analysierten 103 Proben von 34 hämatologisch-onkologischen Patienten mit Fieber und fanden in 33 % der Proben ein positives Ergebnis [Mancini et al. 2008]. Lamothe et al. und auch Guido et al. untersuchten Blutproben hämatologisch-onkologischer Patienten mit Granulozytopenie. Hier war der SF-Test in 35 von 141 Blutproben (25 %) bzw. 38 von 166 Blutproben (22,9 %) positiv [Lamothe et al. 2010, Guido et al. 2012].

Mit einem Erregernachweis bei Fieber in 59 von 225 Proben (26,2 %) konnte in der vorliegenden Studie ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. Mit Abstand am häufigsten wurden wie auch in den BK *CoNS* detektiert.

Der SF-Test wurde initial konzipiert, um Erreger aus dem Vollblut nachzuweisen. Einzelne Arbeitsgruppen setzten den SF-Test auch zur Detektion von Erregern aus anderen klinischen Proben als Blut ein. In bronchoalveolärem Lavage- Material von 53 Patienten mit Pneumonie erbrachte der SF-Test in 35 Proben ein positives Ergebnis (66 %) und war damit der Kultur überlegen (21/53, 40 %) [Baudel et al. 2014]. Rath et al. untersuchten den SF-Test zur Erregerdetektion aus Liquor bei Patienten mit externer Ventrikeldrainage zur Frage einer ventrikulostomie-assoziierten Meningitis. In 18 von 62 Liquorproben (29 %) fiel der SF-Test positiv aus (Liquorkultur: 21/ 62, 34 %) [Rath et al. 2014]. Weitere Evaluationen des SF-Tests liegen bspw. an Biopsiematerial von Herzklappen bei Patienten mit infektiöser Endokarditis [Leli et al. 2014, Fernández et al. 2010] vor.

Der SF-Test kam in den aufgeführten Studien nur zum Einsatz, wenn die Patienten Anzeichen einer Infektion wie z.B. Fieber aufwiesen. Eine größere Untersuchung des SF-Tests im fieberfreien Intervall liegt noch nicht vor. In der hier vorliegenden Arbeit wurden einmal wöchentlich routinemäßig abgenommene Blutproben von Patienten ohne Anzeichen einer Infektion analysiert (insgesamt 622 Proben). In 5,1 % der (einmal wöchentlich abgenommenen) Routineproben wurden mit dem SF-Test Erreger nachgewiesen. Drei Patienten entwickelten wenige Tage später eine kulturell gesicherte Sepsis. Möglicherweise heißt das, dass der SF-Test schon vor Entwicklung von Infektionszeichen relevante Erreger nachweisen konnte (2 x *CoNS*, 1 x *Enterococcus faecium*). Inwiefern sich der SF-Test allerdings als diagnostisches Instrument zur standardmäßigen Patientenüberwachung im fieberfreien Intervall eignet, ist, insbesondere in Anbetracht der großen Anzahl untersuchter Routineproben, fraglich und in weiteren Untersuchungen zu überprüfen. Insbesondere der hohe Anteil an *CoNS* in den untersuchten Routineproben (n = 11) wirft Fragen nach der klinischen Relevanz auf. Das Ergebnis dreier Routineproben, in denen mehr als ein Erreger nachgewiesen wurde, ist mit Vorbehalt zu bewerten: Alle drei Patienten sind unter den ersten zehn eingeschlossenen Patienten; unter Umständen kann in dieser Anfangsphase die Möglichkeit einer Kontamination im Rahmen der Blutentnahme, des Transports oder der Probenaufarbeitung nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

7.1.3 Inhouse-Methode

Bei der IH-Methode handelt es sich um ein (bis zur Anwendung in dieser Untersuchung) nicht-kommerzielles „Real-Time“ PCR-Verfahren zur Detektion und Identifikation von elf verschiedenen *Candida*- und *Aspergillus*-Spezies [Schabereiter-Gurtner et al. 2007]. Mit der IH-Methode wurden in 6,7 % der Proben Pilze nachgewiesen, wobei der Hauptanteil in Routineproben identifiziert wurde. Klinische Zeichen einer Infektion bestanden hier zumeist nicht. Nur bei einem Patienten konnte eine nach EORTC-MSG-Kriterien gesicherte, „wahrscheinliche“ pulmonale Aspergillose detektiert werden.

Das verwendete „Real-Time“ PCR-Verfahren wurde 2007 von der Arbeitsgruppe um Schabereiter-Gurtner et al. entwickelt und überwiegend an Material aus dem Respirationstrakt getestet (19 x BAL, 5 x Bronchialsekret, 2 x Trachealsekret, vier Gewebeproben vom Sinus maxillaris). Dabei konnten in 20 Proben Pilze sowohl mittels Kultur als auch mittels „Real-Time“ PCR nachgewiesen werden. In sechs weiteren Proben war nur die „Real-Time“ PCR positiv. Die einzige, im Rahmen der Studie von Schabereiter-Gurtner et al. untersuchte EDTA-Blutprobe, war in der Kultur negativ, die PCR konnte jedoch *Aspergillus flavus* nachweisen. Das PCR-Ergebnis wurde sowohl histologisch als auch antikörperbasiert mittels GM-ELISA (Galactomannan „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) bestätigt [Schabereiter-Gurtner et al. 2007]. Größere Untersuchungen der „Real-Time“ PCR nach Schabereiter-Gurtner et al. für die Detektion von Pilzen aus dem Blut liegen bislang noch nicht vor. Unter Berücksichtigung der hier erzielten Ergebnisse ist jedoch zu mutmaßen, dass sich das Protokoll von Schabereiter-Gurtner et al. nur bedingt für die Detektion von Pilzen aus EDTA-Blut von hämatologischen Patienten eignet.

Obwohl DNA-Extraktion und PCR unter der Sterilwerkbank bzw. an einem PCR-Arbeitsplatz durchgeführt wurden, sind auch Kontaminationen bei dem manuell durchgeführten Protokoll nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen.

Bei Betrachtung der identifizierten Pilze fällt besonders ein Vertreter der *Aspergillus spp.* ins Auge: *Aspergillus terreus*. Dieser wurde mit Abstand am häufigsten detektiert (n = 26). Baddley et al. untersuchten über einen Zeitraum von sechs Jahren unter anderem die Inzidenz von *Aspergillus terreus*-Infektionen. Bezogen auf alle nachgewiesenen *Aspergillus spp.* (n = 869) in diesem Zeitraum, konnte ein Anstieg von *Aspergillus terreus* von 1,5 % im Jahr 1996 auf 15,4 % im Jahr 2001 nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt ist durchaus bedeutsam, da *Aspergillus terreus* in 87 % der Fälle eine Resistenz gegenüber Amphotericin B zeigt [Baddley et al. 2003]. Lass-Flörl et al. beobachteten das Auftreten invasiver Aspergillosen über einen Zeitraum von zehn Jahren in der Universitätsklinik Innsbruck, Österreich. 67 Patienten mit hämatologisch-

onkologischen Erkrankungen oder Organtransplantationen hatten eine nach EORTC-MSG-Kriterien „bewiesene“ invasive Aspergillose. 32 der 67 Fälle wurden durch *Aspergillus terreus* verursacht. Wenngleich die Inzidenz mit Einführung spezieller raumluftechnischer Anlagen signifikant reduziert werden konnte, traten Infektionen durch *Aspergillus terreus* weiterhin auf. Die Ursache konnte nicht abschließend geklärt werden [Lass-Flörl et al. 2005].

7.2 Diskussion der Ergebnisse des SF-Tests im Vergleich zur BK

SF-Test und BK zeigten in 86,6 % der Fälle übereinstimmende Ergebnisse. Andere Arbeitsgruppen erzielten ähnliche Übereinstimmungsraten: Bei kritisch kranken Patienten mit vermuteter Sepsis stimmte das SF-Testergebnis zu 74,2 – 92,4 % mit dem der BK überein [Dierkes et al. 2009, Wallet et al. 2009, Westh et al. 2009, Avolio et al. 2010, Rath et al. 2012, Grif et al. 2012, Menacci et al. 2012, Pasqualini et al. 2012, Sitnik et al. 2014, Herne et al. 2013], bei (hämatologisch-) onkologischen Patienten mit Granulozytopenie und Fieber konnten Übereinstimmungen von 69 – 83 % erreicht werden [Bravo et al. 2011, Paolucci et al. 2013, Varani et al. 2009, Maubon et al. 2010, Mancini et al. 2008, von Lilienfeld-Toal et al. 2009].

In ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2015 analysierten Dark et al. die Ergebnisse von insgesamt 41 Studien, die den SF-Test im Vergleich zur BK evaluierten und konnten für den SF-Test, passend zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung (Sensitivität: 66 %, Spezifität: 91 %, PPV: 62 %, NPV: 92 %), eine durchschnittliche Sensitivität von 68 % und eine durchschnittliche Spezifität von 86 % kalkulieren [Dark et al. 2015]. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen fallen, insbesondere im Hinblick auf die Sensitivität des Testes, allerdings durchaus heterogen aus. Während beispielsweise Maubon et al. sowie Wallet et al. nur Sensitivitäten von 51 % (Spezifität: 83%, PPV: 74 %, NPV: 69 %) bzw. 40 % (Spezifität: 88 %, PPV: 27 % und NPV: 93 %) erzielten, berichteten Mancini et al. über eine Sensitivität von 95 % (Spezifität: 83 %, PPV: 59 %, NPV: 99 %) [Maubon et al. 2010, Wallet et al. 2009, Mancini et al. 2008]. Die Heterogenität der Ergebnisse liegt sicherlich zum Teil in den unterschiedlichen Patientenkollektiven und dem unterschiedlichen Einsatz antimikrobieller Prophylaxen begründet.

Im Folgenden sollen mögliche Gründe für falsch negative und falsch positive Ergebnisse im SF-Test diskutiert werden. Dark et al. führen als einen der Gründe für falsch negative SF-Testergebnisse auf, dass einige Erreger, die mittels BK identifiziert wurden, nicht im Panel des SF-Tests enthalten sind [Dark et al. 2015]. Diese Möglichkeit ist in der vorliegenden Arbeit jedoch auszuschließen, da solche Fälle nicht mit in die abschließende Bewertung einbezogen wurden. Der SF-Test verfehlte, bei klinisch angegebener und potentiell lebensbedrohlicher Sepsis,

dreimal die Detektion von *CoNS* und zweimal von *Escherichia coli*. Alle Patienten wiesen zu diesem Zeitpunkt (kurz nach allo-SZT) eine schwere Granulozytopenie (Neutrophile Granulozyten $< 500/\mu\text{l}$) auf. Auch bei drei weiteren Patienten, die ein Fieber in der Granulozytopenie boten, konnten mittels BK viermal *CoNS* nachgewiesen werden, während der SF-Test negativ ausfiel. Offenbar lag der Gehalt an detektierbarer Erreger-DNS in diesen Fällen unterhalb der Nachweisgrenze für den SF-Test. Als mitverantwortlich wird die mit der Granulozytopenie einhergehende Reduktion an detektierbarer, phagozytierter Erreger-DNS diskutiert [Von Lilienfeld-Toal et al. 2009]. Auch das im Vergleich zur BK eingesetzte geringere Blutprobenvolumen im SF-Test könnte einen Grund für einen zu niedrigen DNS-Gehalt darstellen [Lamoth et al. 2010]. Bei allen oben genannten Patienten wurde abhängig vom BK-Ergebnis die antibiotische Therapie umgestellt. Da es sich hier um eine nicht-interventionelle Studie gehandelt hat, ist an dieser Stelle nur zu mutmaßen, dass ein negatives SF-Testergebnis nicht oder nur verzögert zu einer Therapieumstellung geführt und somit den weiteren Krankheitsverlauf der Patienten negativ beeinflusst hätte. Als weiterer Grund für ein falsch negatives SF-Testergebnis ist die Möglichkeit von „falsch positiven“ Ergebnissen in der BK nicht völlig außer Acht zu lassen: So wurden bei einem Patienten kulturell *CoNS* nachgewiesen, radiologisch allerdings eine (nach EORTC-MSG-Kriterien mögliche) Pilzpneumonie diagnostiziert. Es ist zu vermuten, dass das BK-Ergebnis in diesem Zusammenhang einer Kontamination entspricht und der SF-Test korrekterweise ein negatives Ergebnis im Hinblick auf einen bakteriellen Erreger herausgegeben hat (ein Pilznachweis wurde allerdings auch im SF-Test nicht erbracht).

Auch für falsch positive Ergebnisse im SF-Test gibt es einige mögliche Gründe. So waren bei drei falsch positiven Nachweisen von *CoNS* und einem Nachweis von *E.coli* zuvor auch die BK mindestens einmal positiv. Somit liegt der Schluss nahe, dass der SF-Test möglicherweise DNS avitaler oder antimikrobiell gehemmter Bakterien detektiert hat [Von Lilienfeld-Toal et al. 2009, Bravo et al. 2011]. Die Interpretation der anderen falsch positiven Ergebnisse ist schwierig. Die Patienten wiesen sämtlich Fieber auf; eine infektiöse Ursache erscheint durchaus plausibel. Allerdings dürfen auch nicht-infektiöse Ursachen für die Entwicklung von Fieber, wie das Zytokinvermittelte Tumorfieber und das Medikamenten-assoziierte Fieber nicht außer Acht gelassen werden [Rieger et al. 2009]. Der Nachweis von *Staphylococcus aureus* bei möglicher IFD und die Detektion von *CoNS* ohne weitere klinische Symptomatik stellten, wie auch der kombinierte Nachweis von *Klebsiella oxytoca/ pneumoniae* und *Staphylococcus aureus*, am ehesten Kontaminationen dar. Auf der anderen Seite gab es Fälle, bei denen eine Bakteriämie nicht unwahrscheinlich erscheint, wie z.B. der *CoNS*-Nachweis bei Mukositis oder der Nachweis von *Klebs-*

iella oxytoca/pneumoniae bei bekannter ESBL-Besiedelung. Obwohl eine Bakteriämie nicht mit einer tatsächlichen Infektion gleichgesetzt werden darf, konnten Von Lilienfeld-Toal et al. zeigen, dass ein positives PCR-Ergebnis mit einer erhöhten Konzentration des Entzündungsparameters Procalcitonin im Blut einhergeht [Von Lilienfeld-Toal et al. 2009]. Bloos et al. schlussfolgerten in ihrer Untersuchung aus dem Jahr 2010, dass der PCR-basierte Nachweis mikrobieller DNS im Blut (auch bei negativen BK) mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert sei [Bloos et al. 2010].

Unterschiedliche Ergebnisse haben SF-Test und BK bei einem Patienten mit Sepsis erbracht. Während kulturell *Streptococcus mitis* nachgewiesen wurde, identifizierte der SF-Test *Streptococcus pneumoniae*. Die Problematik einer Abgrenzung von *Streptococcus pneumoniae* gegenüber anderen *Streptococcae* der *Viridans*-Gruppe mittels molekularer Methoden, deren Analysen häufig auf dem bakteriellen 16S rRNA Gen basieren, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und mit der hohen (> 99 %) Sequenzähnlichkeit des 16S rRNA Gens, insbesondere zwischen *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae*, begründet [Arbique et al. 2004, Richter et al. 2008, Doern & Burnham 2010, Ikryannikova et al. 2012]. Der SF-Test nutzt die heterologere ITS-Region zwischen dem 16S und dem 23S rRNA Gen zur Erregerdiskriminierung. Bezüglich einer Sequenzähnlichkeit zwischen *Streptococcus mitis* und *Streptococcus pneumoniae* in diesem Abschnitt liegen bislang keine Untersuchungen vor.

SF-Test und BK haben in einzelnen Proben mehr als nur einen Erreger detektiert. Beide Methoden wiesen in einer Blutprobe eines Patienten mit Sepsis simultan *Enterococcus faecium* und *CoNS* nach. In drei anderen Sepsisfällen, in denen kulturell nur *CoNS* nachgewiesen wurden, detektierte der SF-Test zusätzlich *Enterococcus faecium*, *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus*. Polymikrobielle Infektionen bei immunsupprimierten Patienten mit malignen Erkrankungen werden in annähernd 15 % der Infektionen beschrieben, häufig allerdings als Kontaminationen oder als Standortflora (z.B. bei einer Probe aus dem Respirationstrakt) gewertet und somit möglicherweise unterschätzt [Rolston et al. 2007]. Interessant ist der simultane Nachweis von *CoNS* und *Aspergillus fumigatus* durch den SF-Test. Der korrekte Nachweis von *CoNS* wird durch die BK bestätigt; der korrekte Nachweis von *Aspergillus fumigatus* wird durch die EORTC-MSG-Kriterien zumindest suggeriert: demnach wurde der beschriebene Fall als mögliche invasive Mykose klassifiziert.

Während der SF-Test bei Fieber in 14 Fällen Pilze nachweisen konnte, waren die BK kein Mal positiv für Pilze. Die Problematik der Detektion von Candidämien bzw. Fungämien durch *Aspergillus* spp. in der BK ist in der Literatur mehrfach beschrieben und wurde in der vorliegenden

Arbeit bereits unter 2.2.1 dargelegt [Clancy & Hong Nguyen 2013, Teixeira et al. 2014, Simoneau et al. 2005].

7.3 Diskussion der Ergebnisse des SF-Test im Vergleich zur IH-Methode

Die EORTC-MSG-Kriterien (vgl. Kapitel 5.2.3) wurden im Jahr 2002 definiert und 2008 unter anderem nochmals überarbeitet, um für klinische und epidemiologische Studien eine einheitliche Diagnosestellung invasiver Mykosen zu ermöglichen. Die Einordnung in die Kategorien „mögliche“, „wahrscheinliche“ und „bewiesene“ invasive Mykose stützt sich auf Risikofaktoren und klinische sowie mykologische Kriterien [Ascioglu et al. 2002, De Pauw et al. 2008]. Wenngleich PCR-basierte Verfahren aufgrund unzureichender Standardisierung und Validierung bislang in den Diagnosekriterien nicht enthalten sind, empfiehlt die AGIHO/ DGHO in ihren Leitlinien aus dem Jahr 2012 auch den Einsatz molekularer Methoden zur Pilzdiagnostik [Ruhnke et al. 2012]. Rogers et al. kommen nach Evaluation zweier *Aspergillus*-spezifischer PCR-Methoden zu dem Schluss, dass der kombinierte Einsatz PCR-basierter Verfahren zusammen mit dem Galactomanan-Test die diagnostische Genauigkeit einer invasiven Aspergillose bei Hochrisikopatienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen verbessert [Rogers et al. 2013]. Auch in einer aktuellen Übersichtsarbeit wird herausgestellt, dass die Kombination verschiedener diagnostischer Methoden (Kultur, Histologie, serologische und molekulare Methoden) möglicherweise derzeit die beste Strategie für eine zügige Diagnosestellung und Therapieeinleitung darstellt [Ruhnke & Schwartz 2016].

Nach allo-SZT diagnostizierten Post et al. bei 23 von 104 Patienten (23 %) eine invasive Aspergillose (13 % bewiesen, 13 % wahrscheinlich, 74 % möglich) und bei drei von 104 Patienten (3 %) eine invasive Candidiasis [Post et al. 2007]. Pagano et al. dokumentierten in ihrer Arbeit, ebenfalls aus dem Jahr 2007, bei 98 von 1249 Patienten nach allo-SZT (7,8 %) eine bewiesene oder wahrscheinliche invasive Mykose. Auch hier standen Infektionen durch Schimmelpilze (86 %), allen voran *Aspergillus fumigatus* (16 von 84 Episoden), im Vordergrund [Pagano et al. 2007].

Die Inzidenz invasiver Mykosen war in der vorliegenden Untersuchung mit 6,9 % (15 von 104 Patienten; 2 wahrscheinliche und 13 mögliche IFD) vergleichsweise gering.

Sowohl SF-Test als auch IH-Methode zeigten mit 98,3% bzw. 97,2 % einen hohen NPV und mit 99,3 % bzw. 93,4 % eine hohe Spezifität. PPV (60,0 %) und Sensitivität (39,1 %) fielen für den SF-Test mäßig aus; PPV (1,9 %) und Sensitivität (4,3 %) der IH-Methode waren gering. White et al. untersuchten 2006 die PCR-basierte Detektion invasiver Aspergillosen bei hämatologischen

Patienten und schlussfolgerten, bei einem ebenfalls hohen NPV von 99,3 %, dass ein negatives PCR-Ergebnis ein guter Indikator zum Ausschluss einer invasiven Aspergillose sei und somit den Einsatz unnötiger antifungaler Therapien minimiere [White et al. 2006].

Sowohl SF-Test (neun positive Proben) als auch IH-Methode (eine positive Probe) konnten eine der beiden wahrscheinlichen invasiven pulmonalen Aspergillosen bestätigen. Bei Von Lilienfeld-Toal et al. wurde durch den SF-Test sogar bei allen Patienten mit wahrscheinlicher IFD (n = 3) *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen [Von Lilienfeld-Toal et al. 2009]. Steinmann et al. untersuchten den SF-Test retrospektiv im Hinblick auf die Detektion von *Aspergillus fumigatus* bei intensivpflichtigen Patienten. Bei 25 von 38 dieser Patienten mit wahrscheinlicher oder bewiesener invasiver Aspergillose fiel der SF-Test positiv aus und zeigte somit ein vielversprechendes Ergebnis [Steinmann et al. 2016].

Bei dem zweiten „wahrscheinlichen“ Fall einer invasiven pulmonalen Aspergillose in der vorliegenden Arbeit wurde im SF-Test in drei Blutproben *Candida albicans* detektiert. Ursächlich für die Fungämie durch *Candida albicans* war am ehesten die gleichzeitig bei dem Patienten bestehende Mukositis mit positivem Rachenabstrich für *Candida albicans*. Die Entwicklung einer schweren Mukositis nach Chemotherapie ist in der Literatur ein bekannter Risikofaktor für die Entwicklung einer Fungämie [Bow et al. 1995].

Zwei der 13 möglichen IFD konnten durch den SF-Test bestätigt werden. Die Diagnose einer möglichen IFD stützt sich nach den EORTC-MSG-Kriterien auf einen Risikofaktor (hier: allo-SZT) und ein klinisches Kriterium, wie dem computertomographischen Nachweis des Halozeichens (milchglasartige Trübung um eine knotige Verdichtung) in der Lunge. Die Inzidenz des Halozeichens bei Patienten mit invasiver Aspergillose nach allo-SZT variiert laut einer Übersichtsarbeit von Georgiadou et al. zum Teil erheblich und liegt zwischen 47 und 75 % [Georgiadou et al. 2011]. Eine Einordnung der negativen PCR-Ergebnisse bei den übrigen elf möglichen invasiven Mykosen bleibt, auch vor diesem Hintergrund, schwierig. Bei allen durch die IH-Methode bei möglicher invasiver Mykose nachgewiesenen Pilzen lag der „Crossing point“-Wert über 56. Die Ergebnisse sind daher in erster Linie als Kontaminationen zu werten.

Interessant ist der Fall eines Patienten mit anhaltendem Fieber und *CoNS*-Nachweis in der BK. Trotz Katheterwechsel und Umstellung der antibiotischen Therapie konnte keine Verbesserung der klinischen Situation erzielt werden. Der SF-Test detektierte bei diesem Patienten, neben *CoNS*, in insgesamt elf Blutproben zusätzlich *Candida albicans*. Auch die IH-Methode war einmalig positiv für *Candida albicans*. Da erst durch die Gabe von liposomalem Amphotericin B eine Verbesserung der klinischen Symptomatik erreicht werden konnte, ist dieser Fall verdächtig

auf das Vorliegen einer polymikrobiellen Sepsis. Bei zwei weiteren Patienten mit einmaligem Nachweis von *Candida krusei* bzw. *Candida albicans* bestanden weder Fieber noch andere klinische Symptome, die auf eine Pilzinfektion hätten schließen lassen. Die Relevanz der SF-Ergebnisse bleibt hier unklar. Falsch-positive Ergebnisse im Hinblick auf eine invasive Aspergillose wurden nicht beobachtet.

7.4 Limitationen

Eine grundsätzliche Einschränkung PCR-basierter Methoden, wie dem SF-Test, ist das eingeschränkte Spektrum an möglichen, detektierbaren Erregern. Ein negatives PCR-Testergebnis schließt eine Infektion durch Erreger, die im Panel nicht enthalten sind nicht aus. Hier liegt die BK mit einem universelleren Testansatz im Vorteil.

Eine weitere Limitation des SF-Tests gegenüber der BK ist die weitgehend fehlende Möglichkeit einer Resistenzbestimmung (Ausnahme: Detektion von MRSA durch den zusätzlichen LightCycler®SeptiFast mecA Test).

Die BK wurde in der vorliegenden Arbeit als Goldstandard des Erregernachweises gewählt. Nicht (oder nur wenig) berücksichtigt wurde der Umstand, dass auch die BK mitunter möglicherweise falsch positive (z.B. Kontaminationen) bzw. falsch negative (z.B. unter antimikrobieller Therapie) Ergebnisse liefert und somit die Interpretation der SF-Testergebnisse erschwert. Peters et al. empfehlen daher bspw. eher, die PCR-Ergebnisse im klinischen Gesamtkontext zu bewerten [Peters et al. 2004].

Der Evaluierungsansatz des SF-Tests war nicht-interventionell, so dass keine Aussage zum Benefit der Patienten im Hinblick auf die Umstellung der antimikrobiellen Therapie in Abhängigkeit vom SF-Testergebnis gemacht werden kann.

Auch wenn der SF-Test im Vergleich zur BK und zur IH-Methode vielversprechende Ergebnisse in der Pilzdetektion geliefert hat, stellt hier die insgesamt geringe Anzahl mittels EORTC-MSG-Kriterien diagnostizierter invasiver Mykosen eine Limitation für die Beurteilung dar.

7.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Der SF-Test bietet im Vergleich zur Blutkultur eine schnelle und spezifische Erregerdetektion in Vollblut hämatologisch-onkologischer Patienten nach allo-SZT. Insbesondere die schnelle Verfügbarkeit der SF-Testergebnisse könnte den Gebrauch inadäquater antimikrobieller Therapien minimieren. Die hier erhobenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der SF-Test möglicherweise eine hilfreiche Methode zur Identifikation polymikrobieller Infektionen darstellt. Auch zum

Nachweis von Pilzinfektionen zeigt der SF-Test durchaus vielversprechende Ansätze und ist hier sowohl gegenüber den Blutkulturen als auch gegenüber der pilzspezifischen Inhouse-Methode überlegen. Auf der anderen Seite ist das Panel an detektierbaren Erregern im Vergleich zur BK eingeschränkt und auch die weitgehend fehlende Möglichkeit einer Resistenzbestimmung stellt ein Defizit des SF-Tests dar. Zudem fiel der SF-Test bei einigen Proben von Patienten mit kulturell gesicherter Sepsis negativ aus. Die alleinige Anwendung des SF-Testes ist somit zu diesem Zeitpunkt nicht zu empfehlen. Patienten nach allo-SZT bei hämatologisch-onkologischer Grunderkrankung könnten aber möglicherweise vom Einsatz einer Kombination aus BK und SF-Test profitieren. Zukünftige Untersuchungen sollten 1. die hier dokumentierten Ergebnisse des SF-Testes bei hämatologisch-onkologischen Patienten nach allo-SZT in größeren Kohorten überprüfen, 2. den SF-Test im Rahmen eines interventionellen Ansatzes bei hämatologisch-onkologischen Patienten nach allo-SZT evaluieren und 3. eine Kosten-Nutzen-Analyse des SF-Tests aufstellen (auch unter Berücksichtigung der Folgekosten durch verzögerte BK-Ergebnisse und somit verzögerten Therapiebeginn).

8 Literaturverzeichnis

- Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, Carvalho Mda G, Steigerwalt AG, Morey RE, Jackson D, Davidson RJ, Facklam RR. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4686-96.
- Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ; Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;34(1):7-14.
- Avolio M, Diamante P, Zamparo S, Modolo ML, Grosso S, Zigante P, Tosoni N, De Rosa R, Stano P, Camporese A. Molecular identification of bloodstream pathogens in patients presenting to the emergency department with suspected sepsis. *Shock* 2010;34(1):27-30.
- Baddley JW, Pappas PG, Smith AC, Moser SA. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5525-9.
- Baudel JL, Tankovic J, Dahoumane R, Carrat F, Galbois A, Ait-Oufella H, Offenstadt G, Guidet B, Maury E. Multiplex PCR performed of bronchoalveolar lavage fluid increases pathogen identification rate in critically ill patients with pneumonia: a pilot study. *Ann Intensive Care* 2014;4:35.
- Baumforth KR, Nelson PN, Digby JE, O'Neil JD, Murray PG. Demystified...the polymerase chain reaction. *Mol Pathol* 1999;52(1):1-10.
- Beekmann SE, Diekema DJ, Doern GV. Determining the clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26(6):559-66.
- Bloos F, Hinder F, Becker K, Sachse S, Mekontso Dessap A, Straube E, Cattoir V, Brun-Buisson C, Reinhart K, Peters G, Bauer M. A multicenter trial to compare blood culture with polymerase chain reaction in severe human sepsis. *Intensive Care Med* 2010;36(2):241-7.

- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101: 1644-55.
- Bow EJ, Loewen R, Cheang MS, Schacter B. Invasive fungal disease in adults undergoing remission-induction therapy for acute myeloid leukemia: the pathogenetic role of antileukemic regimen. *Clin Infect Dis* 1995; 21(2):361-9.
- Bravo D, Blanquer J, Tormo M, Aguilar G, Borrás R, Solano C, Clari MA, Costa E, Munoz-Coba B, Argüeso M, Pineda JR, Navarro D. Diagnostic accuracy and potential clinical value of the LightCycler SeptiFast assay in the management of bloodstream infections occurring in neutropenic and critically ill patients. *Int J Infect Dis* 2011;15(5):e326-31.
- Buchheid D, Baust C, Skladny H, Baldus M, Bräuninger S, Hehlmann R. Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients. *Br J Haematol* 2002;116(4):803-11.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(23):8790-4.
- Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P, Rodrigues F. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol* 2007;45(7):619-27.
- Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the „missing 50%“ of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis* 2013;56(9):1284-92.
- Collin BA, Leather HL, Wingard JR, Ramphal R. Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clin Infect Dis* 2001;33(7):947-53.
- Dark P, Blackwood B, Gates S, McAuley D, Perkins GD, McMullan R, Wilson C, Graham D, Timms K, Warhurst G. Accuracy of LightCycler(®) SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2015;41(1):21-33.

De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Munoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group.; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization für Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Disease Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;46(12):1813-21.

Deutsches Register für Stammzelltransplantation. Jahresbericht 2014. DRST-Geschäftsstelle, c/o Klinik für Knochenmarktransplantation, Universitätsklinikum Essen.

Dierkes C, Ehrenstein B, Siebig S, Linde HJ, Reischl U, Salzberger B. Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. *BMC Infect Dis* 2009;9:126.

Doern CD, Burnham CA. It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 2010;48(11):3829-35.

Einsele H, Bertz H, Beyer J, Kiehl MG, Runde V, Kolb HJ, Holler E, Beck R, Schwerdfeger R, Schumacher U, Hebart H, Martin H, Kienast J, Ullmann AJ, Maschmeyer G, Krüger W, Niederwieser D, Link H, Schmidt CA, Oettle H, Klingebiel T; Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional strategies - guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2003;82(2):175-85.

Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1353-60.

El-Mahallawy HA, Shaker HH, Ali Helmy H, Mostafa T, Razak Abo-Sedah A. Evaluation of pan-fungal PCR assay and Aspergillus antigen detection in the diagnosis of invasive fungal infections in high risk paediatric cancer patients. *Med Mycol* 2006;44(8):733-9.

- Fernández AL, Varela E, Martínez L, Martínez A, Sierra J, González-Juanatey JR, Regueiro B. Evaluation of a multiplex real-time PCR assay for detecting pathogens in cardiac valve tissue in patients with endocarditis. *Rev Esp Cardiol* 2010;63(10):1205-8.
- Fernandez-Molina JV, Abad-Diaz-de-Cerio A, Sueiro-Olivares M, Pellon A, Ramirez-Garcia A, Garaizar J, Pemán J, Hernando FL, Rementeria A. Rapid and specific detection of section *Fumigati* and *Aspergillus fumigatus* in human samples using a new multiplex real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect* 2014;80(2):111-8.
- Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik* 1948;437:55-75.
- Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyiannis DP. The diagnostic value of halo and reversed halo sign for invasive mold infections in compromised hosts. *Clin Infect Dis* 2011;52(9):1144-55.
- Glerant JC, Hellmuth D, Schmit JL, Ducroix JP, Jounieaux V. Utility of blood cultures in community-acquired pneumonia requiring hospitalization: influence of antibiotic treatment before admission. *Respir Med* 1999;93(3):208-12.
- Gluckman E, Boxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321(17):1174-8.
- Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, Einsele H, Cordonnier C; Acute and Chronic Leukemia Working Parties.; Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(9):757-69.
- Grif K, Fille M, Würzner R, Weiss G, Lorenz I, Gruber G, Eschertzhuber S, Nachbaur D, Lass-Flörl C, Orth D. Rapid detection of bloodstream pathogens by real-time PCR in patients with sepsis. *Wien Klin Wochenschr* 2012;124(7-8):266-70.
- Guido M, Quattrocchi M, Zizza A, Pasanisi G, Pavone V, Lobreglio G, Gabutti G, De Donno A. Molecular approaches in the diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Prev Med Hyg* 2012;53(2):104-8.

- Guiver M, Borrow R, Marsh J, Gray SJ, Kaczmarski EB, Howells D, Boseley P, Fox AJ. Evaluation of the Applied Biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;28(2):173-9.
- Hebart H, Löffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Böhme A, Martin H, Engel A, Bunje D, Kern WV, Schumacher U, Kanz L, Einsele H. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis* 2000;181(5):1713-9.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-94.
- Heiniger A, Binder M, Schmidt S, Unertl K, Botzenhart K, Döring G. PCR and blood culture for detection of Escherichia coli bacteremia in rats. *J Clin Microbiol* 1999;37(8):2479-82.
- Herne V, Nelovkov A, Kütt M, Ivanova M. Diagnostic performance and therapeutic impact of LightCycler SeptiFast assay in patients with suspected sepsis. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2013;3(1):68-76.
- Hiemenz JW. Management of infections complicating allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Hematol* 2009;46(3):289-312.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75(3):555-62.
- Hunfeld KP, Bingold T, Brade V, Wissing H. Molecular biological detection of pathogens in patients with sepsis. Potentials, limitations and perspectives. *Anaesthesist* 2008;57(4):326-37.
- Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000;118(1):146-155.
- Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, Savinova T, Filimonova O, Iлина EN, Dubovickaya VA, Sidorenko SV, Govorun VM. Discrimination between Streptococcus pneumoniae and Streptococcus mitis based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(11):1066-71.

- Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2000;38(7):2574-8.
- Karakullukcu A, Kuskucu MA, Ergin S, Aygün G, Midilli K, Küçükbasmaci Ö. Determination of clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;87(3):291-4.
- Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(6):513-20.
- Klastersky J, Ameye L, Maertens J, Georgala A, Muanza F, Aoun M, Ferrant A, Rapoport B, Rolston K, Paesmans M. Bacteraemia in febrile neutropenic cancer patients. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30 Suppl 1:S51-9.
- Kröger N, Zander AR. Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation. In: Kröger N, Zander AR, Hrsg. *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. 3. Auflage, Bremen, Deutschland: UNI-MED Verlag AG, 2011:104-17.
- Kröger N, Zander AR. Konditionierung. In: Kröger N, Zander AR, Hrsg. *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. 3. Auflage, Bremen, Deutschland: UNI-MED Verlag AG, 2011:89-93.
- Krüger WH, Bohlius J, Cornely OA, Einsele H, Hebart H, Massenkeil G, Schüttrumpf S, Silling G, Ullmann AJ, Waldschmidt DT, Wolf HH. Antimicrobial prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation. Guidelines of the infectious diseases working party (AGIHO) of the German Society of Haematology and Oncology. *Ann Oncol* 2005;16:1381-90.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3):95-125.
- Lass-Flörl C, Aigner J, Gunsillus E, Petzer A, Nachbaur D, Gastl G, Einsele H, Löffler J, Dierich MP, Würzner R. Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *Br J Haematol* 2001;113(1):180-4.
- Lass-Flörl C, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, Freund M, Kropshofer G, Dierich MP, Nachbaur D. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br J Haematol* 2005; 131(2):201-7.

- Lamoth F, Jaton K, Prod'homme G, Senn L, Bille J, Calandra T, Marchetti O. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2010;48(10):3510-6.
- Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, Stüber F. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008;197(3):313-24.
- Leitner E, Kessler HH, Spindelboeck W, Hoenigl M, Putz-Bankuti C, Stadlbauer-Köllner V, Krause R, Grisold AJ, Feierl G, Stauber RE. Comparison of two molecular assays with conventional blood culture for diagnosis of sepsis. *J Microbiol Methods* 2013;92(3): 253-5.
- Leli C, Moretti A, Pasticci MB, Cenci E, Bistoni F, Mencacci A. A commercially available multiplex real-time PCR for detection of pathogens in cardiac valves from patients with infective endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79(1):98-101.
- Liesenfeld O, Lehmann L, Hunfeld KP, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: new aspects and recent developments. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2014;4(1):1-25.
- Link H, Böhme A, Cornely OA, Höffken K, Kellner O, Kern WV, Mahlberg R, Maschmeyer G, Nowrousian MR, Ostermann H, Ruhnke M, Sezer O, Schiel X, Wilhelm M, Auner HW; Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO); Group Interventional Therapy of Unexplained Fever, Arbeitsgemeinschaft Supportivmaßnahmen in der Onkologie (ASO) of the Deutsche Krebsgesellschaft (DKG-German Cancer Society). Antimicrobial therapy of unexplained fever in neutropenic patients – guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO), Study Group Interventional Therapy of Unexplained Fever, Arbeitsgemeinschaft Supportivmaßnahmen in der Onkologie (ASO) of the Deutsche Krebsgesellschaft (DKG-German Cancer Society). *Ann Hematol* 2003;82 Suppl 2:105-17.
- Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Crockaert F. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3293-8.
- Mancini N, Clerici D, Diotti R, Perotti M, Ghidoli N, De Marco D, Pizzorno B, Emrich T, Burioni R, Ciceri F, Clementi M. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 2008;57:601-4.

- Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(1):235-51.
- Maubon D, Hamidfar-Roy R, Courby S, Vesin A, Maurin M, Pavese P, Ravanel N, Bulabois CE, Brion JP, Pelloux H, Timsit JF. Therapeutic impact and diagnostic performance of multiplex PCR in patients with malignancies and suspected sepsis. *J Infect* 2010;61(4):335-42.
- Mencacci A, Leli C, Cardaccia A, Meucci M, Moretti A, D'Alò F, Farinelli S, Pagliochini R, Barcaccia M, Bistoni F. Procalcitonin predicts real-time PCR results in blood samples from patients with suspected sepsis. *PLoS One* 2012;7(12):e53279.
- Montassier E, Batard E, Gastinne T, Potel G, de la Cochetière MF. Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32(7):841-50.
- Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, D'Amore G, Leone G, Fadda G. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1999;37(6):1871-5.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
- Nesher L, Rolston KV. The current spectrum of infection in cancer patients with chemotherapy related neutropenia. *Infection* 2014;42(1):5-13.
- Newcombe J, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 1996;34(7):1637-40.
- Oppenheim BA. The changing pattern of infection in neutropenic patients. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 Suppl D:7-11.
- Ott SJ, Musfeldt M, Ullmann U, Hampe J, Schreiber S. Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2566-72.
- Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, Aloisi T, Irrera G, Bonini A, Picardi M, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Melillo L, de Waure C, Reddiconto G, Fianchi L, Valentini CG, Girmenia C, Leone G, Aversa F. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study –

- Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1161-70.
- Paolucci M, Stanzani M, Melchionda F, Tolomelli G, Castellani G, Landini MP, Varani S, Lewis RE, Sambri V. Routine use of a real-time polymerase chain reaction method for detection of bloodstream infections in neutropaenic patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75(2):130-4.
- Pasqualini L, Menacci A, Leli C, Montagna P, Cardaccia A, Cenci E, Montecarlo I, Pirro M, di Filippo F, Cistaro E, Schillaci G, Bistoni F, Mannariono E. Diagnostic performance of a multiple real-time PCR assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward. *J Clin Microbiol* 2012;50(4):1285-8.
- Passweg JR, Baldomero H, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Falkenburg JH, Kröger N, Farge-Bancel D, Gaspar HB, Marsh J, Mohty M, Peters C, Sureda A, Velardi A, Ruiz de Elvira C, Madrigal A; European Group for Blood and Marrow Transplantation. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(9):1161-7.
- Penack O, Becker C, Buchheidt D, Christopeit M, Kiehl M, von Lilienfeld-Toal M, Hentrich M, Reinwald M, Salwender H, Schalk E, Schmidt-Hieber M, Weber T, Ostermann H. Management of sepsis in neutropenic patients: 2014 updated guidelines from the Infectious Diseases Working Party of the German Society of Hematology and Medical Oncology (AGIHO). *Ann Hematol* 2014;93: 1083-95.
- Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2004;4(12):751-60.
- Post MJ, Lass-Floerl C, Gastl G, Nachbaur D. Invasive fungal infections in allogeneic and autologous stem cell transplant recipients: a single-center study of 166 transplanted patients. *Transp Infect Dis* 2007;9(3):189-95.
- Rath PM, Saner F, Paul A, Lehmann N, Steinmann E, Buer J, Steinmann J. Multiplex PCR für rapid and improved diagnosis of bloodstream infections in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2012;50(6):2069-71.
- Rath PM, Schoch B, Adamzik M, Steinmann E, Buer J, Steinmann J. Value of multiplex PCR using cerebrospinal fluid for diagnosis of ventriculostomy-related meningitis in neurosurgery patients. *Infection* 2014;42(4):621-7.

- Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV. Accuracy of phenotypic methods for identification of *Streptococcus pneumoniae* isolates included in surveillance programs. *J Clin Microbiol* 2008;46(7):2184-8.
- Rieger CT, Peterson L, Ostermann H. Fieber unklarer Genese bei malignen Erkrankungen. *Internist (Berl)* 2009;50(6):685-90.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245(2):154-60.
- Roche Diagnostics GmbH. LightCycler® SetiFast Test Mgrade. 2009:1.
- Roche Diagnostics GmbH. Sequenzspezifische Testformate. In: *Evolution der PCR*. 2008:49-58.
- Roche Diagnostics GmbH. Protocol LightCycler® SeptiFast Test Mgrade Version 1_DE, S.11
- Rogers TR, Morton CO, Springer J, Conneally E, Heinz W, Kenny C, Frost S, Einsele H, Loeffler J. Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. *Br J Haematol* 2013;161(4):517-24.
- Rolston KV, Bodey GP, Safdar A. Polymicrobial infection in patients with cancer: an underappreciated and underreported entity. *Clin Inf Dis* 2007;45(2):228-33.
- Roper SM, Tatum OL. Forensic aspects of DNA-based human identity testing. *J Forensic Nurs* 2008;4(4):150-6.
- Ruhnke M, Böhme A, Buchheidt D, Cornely O, Donhuijsen K, Einsele H, Enzensberger R, Hebart H, Heussel CP, Horger M, Hof H, Karthaus M, Krüger W, Maschmeyer G, Penack O, Ritter J, Schwartz S; Infectious Diseases Working Party in Haematology and Oncology of the German Society for Haematology and Oncology. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology – guidelines from the Infectious Diseases Working Party in Haematology and Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (AGIHO). *Ann Oncol* 2012;23(4):823-33.
- Ruhnke M. Hämatologie und Onkologie. In: Grabein B, Kurzai O, Lichtenstern C, Petersen I, Ruhnke M, Weigang MA, Hrsg. *Diagnostik invasiver Mykosen*. 1. Auflage, Stuttgart, Deutschland: Ligatur Verlag für Klinik und Praxis, 2011: 23-38.
- Ruhnke M, Schwartz S. Recent developments in the management of invasive fungal infections in patients with oncohematological diseases. *Ther Adv Hematol* 2016;7(6):345-59.

- Russell NH, Hunter A, Rogers S, Hanley J, Anderson D. Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. *Lancet* 1993;341(8858):1482.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350-4.
- Schabereiter-Gurtner C, Nehr M, Apfalter P, Makristathis A, Rotter ML, Hirschl AM. Evaluation of a protocol for molecular broad-range diagnosis of culture-negative bacterial infections in clinical routine diagnosis. *J Appl Microbiol* 2008;104(4):1228-37.
- Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45(3):906-14.
- Schluger NW, Condos R, Lewis S, Rom WN. Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1994;344(8917):232-3.
- Schreiber J, Nierhaus A, Braune SA, de Heer G, Kluge S. Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 2013;108(4):311-8.
- Schulz B, Weber K, Radecke C, Scheer C, Ruhnke M. Effect of different sample volumes on the DNA extraction of *Aspergillus fumigatus* from whole blood. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(7):686-8.
- Schwarzer G, Türp JC, Antes G. Die Vierfeldertafel (in Diagnosestudien) – Sensitivität und Spezifität. *Dtsch Zahnärztl Z, EbM-Splitter* 2002;57(6):333-4.
- Seifert H, Abele-Horn M, Fätkenheuer G, et al. Blutkulturdiagnostik – Sepsis, Endokarditis, Katheterinfektion, Teil I. In: Mauch H, Podbielski A, Hermann M, Kniehl E, Hrsg. *MiQ 3a*. 2. Auflage, München, Deutschland: Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag, 2007:1-58.
- Serody JS, Berrey MM, Albritton K, O'Brien SM, Capel EP, Bigelow SH, Weber DJ, Gabriel DA, Wiley JM, Schell MJ, Gilligan PH, Shea TC. Utility of obtaining blood cultures in febrile neutropenic patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(5):553-8.

- Simoneau E, Kelly M, Labbe AC, Roy J, Laverdière M. What is the clinical significance of positive blood cultures with *Aspergillus* sp in hematopoietic stem cell transplant recipients? A 23 year experience. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(3):303-6.
- Sinkó J, Csomor J, Nikolova R, Lueff S, Kriván G, Reményi P, Bátaí A, Masszi T. Invasive fungal disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: an autopsy-driven survey. *Transpl Infect Dis* 2008;10(2):106-9.
- Sitnik R, Marra AR, Petroni RC, Ramos OP, Martino MD, Pasternak J, Santos OF, Manguiera CL, Pinho JR. SeptiFast for diagnosis of sepsis in severely ill patients from a Brazilian hospital. *Einstein (Sao Paulo)* 2014;12(2):191-6.
- Skvarc M, Stubljar D, Rogina P, Kaasch AJ. Non-culture-based methods to diagnose bloodstream infection: Does it work? *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2013;3(2):97-104.
- Song JH, Cho H, Park MY, Na DS, Moon HB, Pai CH. Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31(6):1439-43.
- Steinmann J, Buer J, Rath PM. Detection of *Aspergillus fumigatus* in Blood Samples from Critically Ill Patients in Intensive Care Units by Use of SeptiFast Assay. *J Clin Microbiol* 2016;54(7):1918-27.
- Tafelski S, Nachtigall I, Adam T, Bereswill S, Faust J, Tamarkin A, Trefzer T, Deja M, Idelevich EA, Wernecke KD, Becker K, Spies C; Molecular Diagnostic of Sepsis Study Group. Randomized controlled clinical trial evaluating multiplex polymerase chain reaction for pathogen identification and therapy adaptation in critical care patients with pulmonary or abdominal sepsis. *J Int Med Res* 2015;43(3):364-77.
- Tang CM, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen J. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 1993;148(5):1313-7.
- Teixeira H, Magalhaes JJ, Matias C, Lyra JM, Magalhaes V, Lucena-Silva N, Melo HR, Jucá MB, Brito CA. Evaluation of multiplex PCR in first episodes of febrile neutropenia as a tool to improve early yeast diagnosis in leukemic/ preleukemic patients. *Support Care Cancer* 2014; 22(10):2861-6.
- Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-16.

- Till JE, McCulloch EA. Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo. *Radiat Res* 1963;18:96-105.
- Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964;51:29-36.
- Varani S, Stanzani M, Paolucci M, Melchionda F, Castellani G, Nardi L, Landini MP, Baccarani M, Pession A, Sambri V. Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J Infect* 2009;58(5):346-51.
- Vince A, Lepej SZ, Barsic B, Dusek D, Mitrovic Z. LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *J Med Microbiol* 2008;57:1306-7.
- Von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, Hahn-Ast C, Orlopp KS, Marklein G, Purr I, Cook G, Hoeft A, Glasmacher A, Stüber F. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2405-10.
- Wallet F, Nseir S, Baumann L, Herwegh S, Sendid B, Boulo M, Roussel-Delvallez M, Durocher AV, Courcol RJ. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(6):774-9.
- Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300(19):1068-73.
- Weiß C. Studien zu Diagnostik und Prävention. In: Weiß C, Hrsg. *Basiswissen Medizinische Statistik*. 5. Auflage, Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag, 2010:287-302.
- Westh H, Lisby G, Breysse F, Bøddinghaus B, Chomarat M, Gant V, Goglio A, Raglio A, Schuster H, Stuber F, Wissing H, Hoeft A. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(6):544-51.
- White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis* 2006;42(4):479-86.
- Wilhelm J, Pingoud A. Real-Time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 2003;4(11):1120-8.

- Wingard JR. Opportunistic infections after blood and marrow transplantation. *Transpl Infect Dis* 1999;1(1):3-20.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-Time multiplex PCR assays. *Methods* 2001;25(4):430-42.
- Yang S, Lin S, Kelen GD, Quinn TC, Dick JD, Gaydos CA, Rothman RE. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3449-54.
- Young BD. Molecular biology in medicine. *Postgrad Med J* 1992;68(798):251-62.
- Zucol F, Ammann RA, Berger C, Aebi C, Altwegg M, Niggli FK, Nadal D. Real-time quantitative broad-range assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8):2750-9.

9 Anhang

9.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sandra Elges, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluierung des SeptiFast-Testsystems bei hämatologischen Patienten nach Stammzelltransplantation/ Knochenmarktransplantation im Vergleich zur Blutkultur und einem alternativen PCR-System“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9.2 Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht“

9.3 Publikationsliste

Elges S, Arnold R, Uharek L, Adam T, Mikolajewska A, Ruhnke M. Prospective evaluation of SeptiFast test in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation; 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 2012, London, United Kingdom, Poster.

Elges S, Arnold R, Uharek L, Adam T, Mikolajewska A, Ruhnke M. Prospective evaluation of SeptiFast test in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation; 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), 2012, Berlin, Germany, Poster.

Fielitz K, Althoff K, De Preter K, Nonnekens J, Ohli J, Elges S, Hartmann W, Klöppel G, Knösel T, Schulte M, Klein-Hitpass L, Beisser D, Reis H, Eyking A, Cario E, Schulte JH, Schramm A, Schüller U. Characterization of pancreatic glucagon-producing tumors and pituitary gland tumors in transgenic mice overexpressing MYCN in hGFAP-positive cells. *Oncotarget* 2016;7(46):74415-74426.

Huss S, Elges S, Trautmann M, Sperveslage J, Hartmann W, Wardelmann E. Classification of KIT/PDGFR α wild-type gastrointestinal stromal tumors: implications for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015;15(6):623-8.

Koopmann M, Weiss D, Steiger M, Elges S, Rudack C, Stenner M. Thyroid cartilage invasion in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma treated with total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2016;273(11):3789-3794.

Eingereicht zur Publikation:

Elges S, Arnold R, Liesenfeld O, Kofla G, Mikolajewska A, Schwartz S, Uharek L, Ruhnke M. Prospective evaluation of the SeptiFast multiplex real-time PCR assay for surveillance and diagnosis of infections in haematological patients after allogeneic stem cell transplantation compared to routine microbiological assay and an in-house real-time PCR-method. *Mycoses* (IF: 2,3).

9.4 Danksagung

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Dr. Markus Ruhnke für die Überlassung des Dissertationsthemas und die wissenschaftliche Begleitung sowie Herrn PD Dr. Stefan Schwartz für die Übernahme der Promotionsbetreuung danken.

Auch Frau Prof. Dr. Renate Arnold und sämtlichen Mitarbeitern der KMT-Station des Virchow-Klinikums möchte ich für die Gewährung der Dateneinsicht und die zuverlässige Einsendung der Patientenproben meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Clarissa Radecke, die mich mit großer Ruhe, Geduld und Kompetenz in die Laborabläufe eingeführt hat und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Für die wertvollen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft möchte ich mich von Herzen bedanken.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei all den lieben Menschen aus dem Freundes- und Familienkreis, die mir auf unterschiedliche Art und Weise unterstützend beigestanden und somit nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.