



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Vergleich und Sensitivitätssteigerung molekularer Analysen zum Nachweis von *Aspergillus fumigatus*-DNA und Azol-Resistenz-Mutationen in klinischen Proben von Hochrisiko-Patient*innen

Autor: Julian Thater, geb. Skladny
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik
Doktormutter: Prof. Dr. B. Spieß

Aspergillus fumigatus ist ein weltweit verbreiteter Schimmelpilz, der insbesondere bei immunsupprimierten Patient*innen schwerwiegende Infektionen verursachen kann. Die invasive Aspergillose stellt hierbei eine der häufigsten und klinisch relevantesten Manifestationen dar und ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert. Die sichere Diagnosestellung stellt weiterhin eine große Herausforderung dar, da klassische mikrobiologische Methoden oft sensitivitätsarm, zeitaufwändig und durch erschwerte Probengewinnung limitiert sind. Molekulare Verfahren, insbesondere die Echtzeit-PCR, gewannen daher zunehmend an Bedeutung, da sie einen schnellen, sensitiven Nachweis direkt aus klinischem Material erlauben und Aussagen zur Speziesdifferenzierung sowie zu Resistenzmutationen ermöglichen. Trotz dieser Vorteile fand die PCR in den damaligen europäischen Kriterien zur Definition einer invasiven Aspergillose von 2008 aufgrund mangelnder Standardisierung keine Berücksichtigung.

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, zur Standardisierung der molekularen PCR-Methoden beizutragen, indem die diagnostische Wertigkeit des kommerziellen AsperGenius® Species Kits evaluiert wurde. Die Sensitivität betrug 64%, 75% und 56% direkt aus klinischen Proben, die mittels bronchoalveolärer Lavage, Biopsien und Liquorpunktionen gewonnen wurden und konnte durch Anpassung des Cyclex-Schwellenwertes oder Kombination mit dem Biomarker Galactomannan ohne signifikante Reduktion der Spezifität gesteigert werden. In einem direkten Vergleich des AsperGenius® Species Kits mit der diagnostischen in-house *Aspergillus*-PCR, wurden vom kommerziellen Assay signifikant weniger als positiv eingestufte Proben erkannt und auch bei der Bestimmung der Detektionsschwelle zeigten sich schlechtere Ergebnisse mit einem Faktor von 100 sowohl gemessen in Sporen- als auch DNA-Verdünnungsreihen.

In der Therapie von invasiven Aspergillosen spielen Azolantimykotika eine zentrale Rolle und eine zunehmende Azolresistenz von *Aspergillus fumigatus* stellt eine wachsende Herausforderung in der Behandlung dar. Hierfür sind häufig Genmutationen im *cyp51A*-Gen verantwortlich, die schnell mittels PCR mit nachfolgender Schmelzkurvenanalyse oder Sanger-Sequenzierung entdeckt werden können. Hieraus ergab sich eine weitere Fragestellung dieser Dissertation: die Bestimmung der Sensitivität der hierfür in-house entwickelten Resistenz-PCRs plus Sanger-Sequenzierung sowie den Vergleich mit dem kommerziell erhältlichen AsperGenius® Resistance Kit. Im direkten Vergleich zeigte sich für bronchoalveoläre Lavageproben und einzelne Mutationen eine höhere Sensitivität für die in-house Resistenz-PCRs mit konsistent niedrigeren Detektionsschwellen in den Sporenverdünnungsreihen. Beide Assays zeigten eine zuverlässige Unterscheidung zwischen Wildtyp und mutierter Sequenz, sofern Pilz-DNA detektiert wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in-house Assays sowohl für die *Aspergillus* DNA-Detektion als auch die Mutationsbestimmung eine höhere Sensitivität als die kommerziellen AsperGenius® Kits aufweisen. Von Nachteil ist aber die deutlich längere Bearbeitungszeit dieser herkömmlichen PCRs im Gegensatz zu den neueren Echtzeit-Systemen. Die PCR insgesamt kann aber schnelle und vor allem in Kombination mit dem Biomarker Galactomannan verlässliche Hinweise auf eine invasive Aspergillose geben. Diese Einschätzung wurde 2020 durch die Aufnahme der *Aspergillus*-PCR in die europäischen Diagnose-Kriterien bestätigt. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte ein Beitrag zur Standardisierung und Optimierung der molekularen Diagnostik invasiver Aspergillosen bei Hochrisikopatient*innen geleistet werden. Angesichts der zunehmenden klinischen Relevanz dieses Krankheitsbildes besteht jedoch weiterhin erheblicher Forschungsbedarf in diesem Bereich.