

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln

Klinik I für Innere Medizin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

**Epidemiologie von *Aspergillus terreus* am Klinikum der
Universität zu Köln:
Molekulare Typisierung von Umwelt- und Patientenisolaten –
Eine Maßnahme zur Qualitätssicherung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sarah R. Gerlach
aus Köln

Promoviert am:
06. April 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2011

Druck. Copy team cologne GmbH, Köln

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Professor Dr. med. O. A. Cornely
2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. H. Seifert

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:
Herrn Professor Dr. med. Oliver A. Cornely

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.



Köln, den 09. Juli 2010

Sarah Gerlach

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Luftkeimsammlungen sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Universitätsprofessor Dr. med. Cornelia Lass-Flörl aus dem Department für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin der Medizinischen Universität Innsbruck, Fritz-Pregl-Straße 3, A-6020 Innsbruck, von mir selbst durchgeführt worden.

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen der Isolate sowie deren Anzucht und Konservierung sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. Astrid Mayr aus dem Department für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin der Medizinischen Universität Innsbruck, Fritz-Pregl-Straße 3, A-6020 Innsbruck, sowie durch Herrn Juniorprofessor Dr. Guido Fischer aus dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin des Universitätsklinikum Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074, Aachen, von mir selbst durchgeführt worden.

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Untersuchungen der Patienten mittels Nasenabstrich sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. Astrid Mayr aus dem Department für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin der Medizinischen Universität Innsbruck, Fritz-Pregl-Straße 3, A-6020 Innsbruck, von mir selbst durchgeführt und ausgewertet worden.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden molekularbiologischen Untersuchungen sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. Katharina Grif aus dem Department für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin der Medizinischen Universität Innsbruck, Fritz-Pregl-Straße 3, A-6020 Innsbruck, von mir gemeinsam mit Frau Dr. rer. nat. Katharina Grif im Department für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin der Medizinischen Universität Innsbruck durchgeführt worden. Die Auswertung des Bildmaterials ist von Frau Dr. rer. nat. Katharina Grif ohne meine Mithilfe durchgeführt worden.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende statistische Auswertung der gewonnenen Daten sind von mir durchgeführt worden. Die statistische Auswertung der meteorologischen Parameter im Rahmen einer multiplen linearen Regressionsanalyse sind von Herrn Privatdozent Dr. rer. medic. Martin Hellmich, Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Statistik, Informatik und Epidemiologie, der Uniklinik Köln durchgeführt worden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Professor Dr. med. Oliver A. Cornely, Leiter des klinischen Studienzentrums Infektiologie II, medizinischer Leiter des ZKS Köln, Leiter des klinischen Studienzentrums Onkologie, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln, für die Bereitstellung des Themas sowie die Betreuung und Unterstützung während der Erstellung der Arbeit.
- Universitätsprofessor Dr. med. Cornelia Lass-Flörl, Direktorin der Sektion für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Department für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin der Medizinischen Universität Innsbruck, Österreich, für die Bereitstellung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und der Materialien für die molekulare Genotypisierung sowie die zahlreich beantworteten Fragen.
- Den Firmen Essex GmbH, München, Gilead Sciences, Martinsried und Pfizer Pharma GmbH, Berlin für die finanzielle Unterstützung.
- Dr. rer. nat. Guido Fischer, für die Leihgabe der Luftkeimsammler und die Anleitung zur mikroskopischen Identifikation der Schimmelpilze.
- Privatdozentin Dr. med. Pia Hartmann für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und Lagerungsmöglichkeiten.
- Dr. rer. nat. Katharina Grif und Dr. rer. nat. Astrid Mayr für ihre tatkräftige Unterstützung und Anleitung sowie Analysen im Rahmen der molekularen Genotypisierung.
- Dr. med. Maria J. G. T. Rüping und Dr. med. Jörg J. Vehreschild für die tatkräftige Unterstützung und die Anregungen.
- Meinem Lebensgefährten Dipl. Biol. Christoph Lenders für seine Unterstützung und sein Verständnis.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Pilze	10
1.1.1 Taxonomie und Klassifikation der Pilzgattungen	11
1.1.2 Gestalt und Struktur der Pilze	12
1.1.3 Genus: <i>Aspergillus</i>	13
1.1.3.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
1.1.3.2 <i>Aspergillus flavus</i>	16
1.1.3.3 <i>Aspergillus niger</i>	17
1.2. Pilzinfektionen und ihre Einteilung	22
1.3 Die Aspergillose	22
1.4 Systemische Aspergillosen	23
1.5 Die invasive Aspergillose im Detail	24
1.5.1 Der Pathomechanismus der invasiven Aspergillose	24
1.5.2 Patientenbezogene Risikofaktoren	25
1.5.3 Diagnostik der invasiven Aspergillose	26
1.5.4 Definition einer invasiven Mykose nach den Kriterien der EORTC/MSG	28
1.5.5 Therapiemöglichkeiten der invasiven Aspergillose	30
1.6 Zielsetzung der Arbeit	32
2. Fragestellung	33
3. Material und Methoden	35
3.1 Material	35
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	35
3.1.2 Gerätschaften und Zubehör	35
3.1.3 Kits und Inhalte	36
3.1.4 Kulturmedien	38
3.1.5 Primer	38
3.1.6 Software	38
3.1.7 Verbrauchsmaterialien	39
3.2 Methoden	40
3.2.1 Luftproben	40
3.2.1.1 Orte der Luftprobengewinnung	40
3.2.1.2 Vorgang der Luftprobengewinnung	43
3.2.2 Meteorologische Parameter	44

3.2.2.1 Temperatur.....	45
3.2.2.2 Relative Luftfeuchtigkeit	45
3.2.2.3 Taupunkt	45
3.2.2.4 Windgeschwindigkeit	46
3.2.2.5 Luftdruck	46
3.2.3 Patienten	46
3.2.3.1 Einschlusskriterien.....	46
3.2.3.2 Ausschlusskriterien.....	46
3.2.3.3 Patientendaten.....	47
3.2.3.4 Entnahme der Patientenproben	47
3.2.3.5 Weiterverarbeitung der Patientenproben	47
3.2.4 Identifikation und Konservierung der Pilze	48
3.2.4.1 Makroskopische Beurteilung der Reinkulturen.....	48
3.2.4.2 Mikroskopische Beurteilung der Reinkulturen.....	48
3.2.4.3 Konservierung von <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> und <i>A. terreus</i>	49
3.2.5 Molekulare Genotypisierung der <i>A. terreus</i> Stämme	50
3.2.5.1 DNA-Extraktion mit DNeasy Blood and Tissue Kit (250) von Qiagen	50
3.2.5.2 DNA-Extraktion mit Ultra Clean von Mo Bio Laboratories [15]	53
3.2.5.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis	56
3.2.5.4 Agarosegelelektrophorese	59
3.2.5.5 Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR).....	60
3.2.5.6 Auswertung der rep-PCR mittels DiversiLab System®	63
3.2.6 Resistenztestung der <i>A. terreus</i> Stämme für Amphotericin B mittels Epsilon-Test	66
3.2.7 Statistische Analyse	66
4. Ergebnisse	67
4.1 Gesamtzahl und species-abhängige Anzahl der isolierten Pilze im Innen- und Außenraum während der 12-monatigen Beobachtungsperiode	67
4.2 Prozentualer Anteil der einzelnen Pilzstämme an der Gesamtzahl der im Studienzeitraum isolierten Pilze	68
4.3 Absolute Zahl der ausgewählten Aspergillus-Arten und der nicht näher identifizierten Pilze je Messpunkt.....	72
4.4 Konzentration von <i>Aspergillus</i> spp. in der Außenluft während der 12-monatigen Beobachtungsperiode	73
4.5 Konzentration von <i>Aspergillus</i> spp. in den Innenräumen der hämatonkologischen Station im Bettenhaus der Uniklinik Köln während der 12-monatigen Beobachtungsperiode	74

4.6 Vergleich der Konzentrationen von <i>Aspergillus</i> spp. im Außen- und Innenbereich der Uniklinik Köln.....	76
4.7 Konzentration von <i>Aspergillus</i> spp. an den einzelnen Messpunkten auf der hämatookologischen Station.....	78
4.7.1 Normalstation.....	78
4.7.2 Stammzelltransplantationsstation (Isolierstation, KMT).....	80
4.7.3 Vergleich von Normalstation und Stammzelltransplantationsstation.....	81
4.7.4 Anzahl der KBE/m ³ je Monat im Bereich der Aufzüge	83
4.7.5 Personen- und Bettenaufzüge.....	85
4.7.6 Materialwarentransport.....	86
4.7.7 Vergleich der Personen- und Bettenaufzüge mit dem Materialwarentransportbereich.....	88
4.7.8 Gang der Normalstation.....	90
4.7.9 Vergleich der KBE/m ³ auf dem Gang und vor den Aufzügen	91
4.8 Konzentration von <i>Aspergillus</i> spp. im Foyer der Uniklinik Köln während der 12-monatigen Beobachtungsperiode	93
4.9 Patientenkollektiv und Gesamtzahl der gewonnenen Nasenabstriche während der 12-monatigen Beobachtungsperiode	95
4.10 Anzahl der Patienten, welche im Studienzeitraum an einer invasiven Aspergillose erkrankten	96
4.11 Meteorologische Parameter innerhalb des Studienzeitraumes und Ihre Zuordnung zu den Jahreszeiten.....	96
4.11.1 Temperatur.....	96
4.11.2 Relative Luftfeuchtigkeit	98
4.11.3 Taupunkt.....	99
4.11.4 Windgeschwindigkeit	100
4.11.5 Luftdruck	101
4.11.6 Vergleich der meteorologischen Daten mit den Werten der mittleren Konzentration in KBE/m ³ für <i>Aspergillus</i> spp. im Außen- und Innenbereich.....	103
4.12 Verwandtschaftsgrade der mittels Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis untersuchten <i>A. terreus</i> -Stämme	107
4.12.1 Primer C II.....	107
4.12.2 Primer R 108.....	109
4.12.3 Primer P 4	111
4.13 Verwandtschaftsgrade der mittels Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) untersuchten <i>A. terreus</i> -Stämme.....	112
4.14 Zusammenfassende Beurteilung der einzelnen PCR-Ergebnisse	114
4.15 Amphotericin B-Empfindlichkeit der isolierten <i>A. terreus</i> -Stämme im Epsilometer-Test	115

5. Diskussion	116
6. Zusammenfassung	123
7. Literaturverzeichnis	125
8. Vorabveröffentlichungen	132
8.1 Beiträge zu wissenschaftlichen Kongressen (Abstracts und Poster)	132
8.2 Vorträge	133
9. Curriculum vitae	134

1. Einleitung

1.1 Pilze

Pilze sind hochentwickelte eukaryontische Zellen. Von ihnen existieren weit mehr als 1.000.000 Arten, sie stellen rund $\frac{1}{4}$ der Biomasse unserer Erde dar [51]. Somit ist es nicht verwunderlich, dass Pilze sowohl für den Kreislauf organischer Stoffe in der Natur, als auch seit geraumer Zeit in der Industrie eine immense Rolle spielen. Sie leben in Symbiosen mit Pflanzen und unterstützen diese in ihrem Wachstum [51]. Sterben Pflanzen ab, so besitzen Pilze die nötigen Enzyme, welche beispielsweise Lignin, einen Bestandteil der Pflanzen, abbauen können [51]. Sie zersetzen also totes organisches Material und dienen damit der Wiederverwertung toter Pflanzen. Zusätzlich können sie als „Biowaffe“ im Pflanzenbau zur Bekämpfung von Schädlingen und zum Schutz der Pflanzen eingesetzt werden [51]. Neben dieser Rolle der Pilze in der Ökologie, dienen sie in der Industrie zur Reifung und Produktion von fermentierten Lebensmitteln, wie Bier, Wein und Brot. Dabei können sie zu einer Strukturveränderung der Grundstoffe, einer Geschmacksveränderung und einer Entstehung wertvoller Nährstoffe beitragen. Als Beispiel seien der Roquefortkäse sowie Sojasauce genannt. In der pharmazeutischen Industrie haben Pilze einen erheblichen Wert für die Herstellung von Antibiotika und irritierenderweise für die Herstellung von Antimykotika, so zum Beispiel die Echinocandine, deren Muttersubstanz aus einem Pilz - *Papularia sphaerosperma* – gewonnen wurde [115]. Auch andere Pilzmetaboliten haben Einzug in die Pharmazie gefunden, erwähnt seien hier die Statine, wie Mevinolin von *Aspergillus terreus*, sein halbsynthetisches Derivat Simvastatin, welche beide die Bildung von Cholesterin im Menschen unterbinden, und Cyclosporin A, ein Metabolit von *Tolypocladium inflatum*, welches die Funktion der T-Lymphozyten hemmt und als Immunsuppressivum verwendet wird [51]. Gentechnisch veränderte Pilze können genutzt werden um Impfstoffe herzustellen, so zum Beispiel die Bäckerhefe, welche für die Produktion aktueller Hepatitis-B-Impfstoffe (Gen-HB-Vax[®], Engerix B[®]) verwendet wird [51, 77].

Neben diesen positiven Eigenschaften, können Pilze jedoch auch nachteilige Folgen für Mensch und Natur haben. Es existieren folglich Pilze, welche durch eine spezielle genetische Ausstattung in die Lage versetzt sind, lebende Zellen zu attackieren und

den Wirt zu schädigen, sodass dieser Krankheitssymptome entwickelt. In Landwirtschaft und Gartenbau sorgen sogenannte phytopathogene Pilze für Infektionen unter den Nutzpflanzen und erhebliche Produktionsverluste. Für die Gesundheit des Menschen stellt die Mehrzahl der Pilze überhaupt keine Gefahr dar. Nur wenige Arten – ca. 150 – sind dazu fähig, den Menschen zu infizieren und entzündliche, schädigende Reaktionen auszulösen [51]. In der Medizin spielen insbesondere die Allergie, die Intoxikation und die Infektion eine Rolle [34]. Eine Ausbildung einer Infektion beim gesunden Menschen wird selten beobachtet, daher spielt die Funktionalität des Immunsystems des Wirtsorganismus eine ganz besondere Rolle für die Krankheitsentstehung. Opportunistische invasive Pilzinfektionen stellen einen der Hauptgründe für die Morbidität und Sterblichkeit immunsupprimierter Patienten dar [4, 10, 36, 65, 75]. Insbesondere zeigt sich eine Zunahme der durch *Aspergillus* spp. verursachten Infektionen während des letzten Jahrzehnts [11, 27, 32, 65, 67].

1.1.1 Taxonomie und Klassifikation der Pilzgattungen

Die wissenschaftlich exakte Einteilung und Benennung von Pilzen erfolgt nach den Regeln der Botanik. In diesem System werden Pilze nach Verwandtschaftsverhältnissen unterteilt und zugeordnet. Weitere Einteilungskriterien sind morphologische, physiologische, biochemische und genetische Merkmale. Grob vereinfacht unterscheidet dieses System zwischen den Myxomyceten, den Oomyceten und den Eumyceten. Bei den echten Pilzen (Eumyceten) werden nochmals niedere und höhere Pilze unterschieden. *Aspergillus* spp. zählt zu den „Schlauchpilzen“ (Ascomycota) und somit zu den höheren Pilzen [51, 100].

Eine praktische, simplifizierte Einteilung der Pilze findet sich in der medizinischen Mykologie: Das DHS-System. In der medizinischen Praxis wird ungeachtet der taxonomischen Klassifikation diese einfachere Einteilung von möglichen humanpathogenen, medizinisch bedeutsamen Pilzen angewendet. Das DHS-System unterscheidet zwischen Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilzen. *Aspergillus* spp. zählt hier zu den Schimmelpilzen [33, 51].

Dermatophyten: Dermatophyten sind keratinophil und infizieren die Haut und Hautanhangsgebilde, wie Nägel und Haare. Sie werden nochmals in drei

Untergruppen eingeteilt: Trichophyton, Microsporum und Epidermophyton. Tinea ist der Sammelbegriff für oberflächliche Dermatomykosen, unabhängig von der verursachenden Pilzspezies. Tinea pedis ist die häufigste Dermatomykose in den Industrieländern [33, 46, 51, 52, 95].

Hefen: Hefen können Haut-, Schleimhaut- und Systemmykosen verursachen. Typische Erkrankungen sind Kandidose und Soor. Systemmykosen können zu Organbefall und einer schweren Sepsis führen. Die bei Infektionen am häufigsten vorkommende Hefe ist *Candida albicans* [33, 51, 76, 85, 96].

Schimmelpilze: Schimmelpilze können ebenfalls zu Haut-, Schleimhaut- und Systemmykosen führen. Desweiteren erlangen sie eine humanmedizinische Relevanz als Mykotoxinbilder und Allergene. Pilzantigene sind die häufigsten Allergene überhaupt. Einer der wichtigsten Vertreter ist *Aspergillus* spp. Typische durch *Aspergillus* spp. hervorgerufene Krankheitsbilder sind das Lungen-Aspergillom, eine Aspergilluspneumonie oder auch ein Asthma bronchiale und viele weitere [33, 36, 51, 52, 65].

1.1.2 Gestalt und Struktur der Pilze

Pilze besitzen kein Chlorophyll und keine Plastiden. Sie leben als Saprophyten oder Parasiten auf dem Land und im Süßwasser, weitaus seltener im Meer. Sie sind nicht zur autotrophen Versorgung befähigt, sondern sind hinsichtlich des Kohlenstoffes und manche auch bezüglich des Stickstoffes und gewisser Wirkstoffe heterotroph. Sie sind eukaryontische Organismen, welche einen Thallus (Lager) bilden, der meist von einer Zellwand aus Chitin und Glukanen umgeben ist. Der Vegetationskörper ist selten bläschen- oder tröpfchenförmig, häufiger fädig. Der einzelne Pilzfaden wird Hyphe, die Gesamtheit von Hyphen außerhalb von Fruchtkörpern Myzel genannt. In den Fruchtkörpern sind die Hyphen zu Flechtthalli verflochten. Als Substrathyphe oder auch vegetative Hyphe bezeichnet man eine in den Nährboden (Kultur) wachsende Hyphe. Die gesamten vegetativen Hyphen bilden das vegetative Myzel. Die aus den Substrathyphen wachsenden Seitenhyphen werden in ihrer Gesamtheit Luftmyzel genannt. Die Oberfläche des Luftmyzels kann sich pudrig wattig oder glabrös zeigen [1, 33, 51, 100].

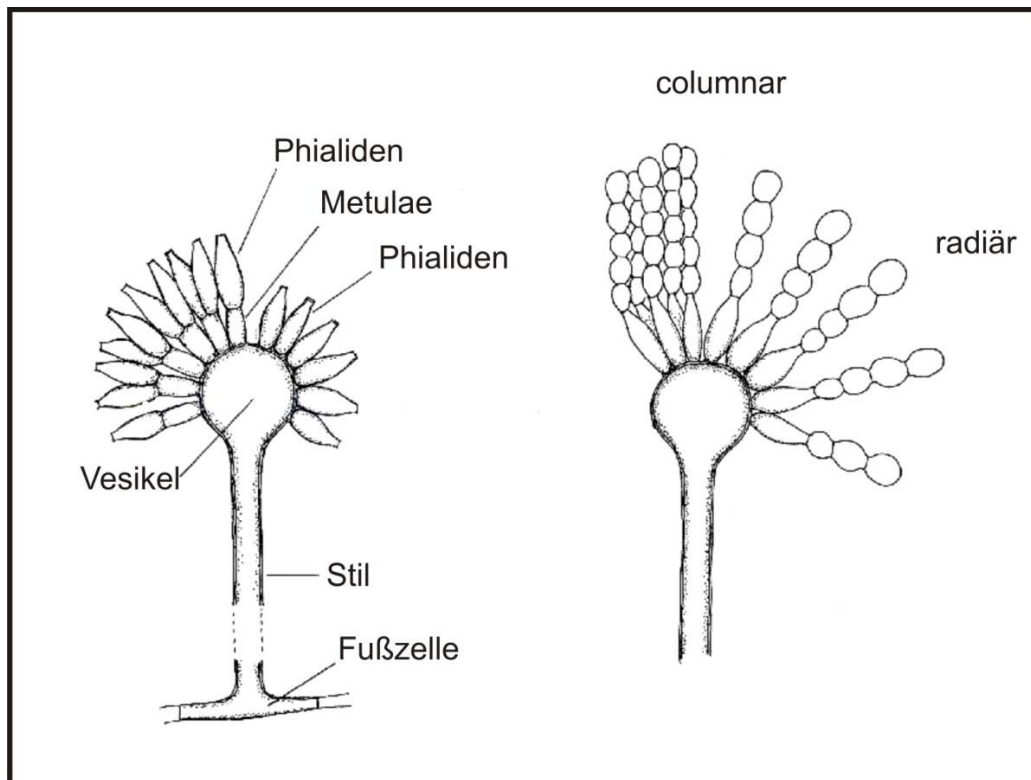
1.1.3 Genus: *Aspergillus*

Die Kolonien wachsen in der Regel schnell. Sie sind pudrig und weisen eine Farbgebung von weiß, grün oder gelb, bis hinzu braun oder schwarz auf. Die Konidiophoren stehen aufrecht und dicht, sie wachsen unverzweigt und haben apikal geschwollene, einer Kugel ähnelnde, Vesikel. Die Stile sind nicht septiert und haben eine so genannte Fußzelle, welche für das Genus *Aspergillus* charakteristisch ist. Die Phialiden können direkt aus dem Vesikel entspringen (uniseriat) oder auf den Metulae entstehen (biseriat). An den Phialiden, welche in ihrer Struktur einer Flasche ähneln, entstehen die Konidien und bilden Ketten. Die Konidien, welche durch Knospung entstehen, geben dem Konidienkopf sein typischen Aussehen: Wachsen die Konidien in langen, zusammenhaftenden Ketten von den Phialiden, entsteht ein säulenförmiges Bild des Konidienkopfes (columnar). Wachsen sie radiär, so nimmt der Konidienkopf ein kugeliges oder keilförmiges Aussehen an (radiär) (**Abbildung 1**). Die Konidien selbst können glattwandig oder rau, (sub)hyalin oder pigmentiert sein. Einige Arten können zudem die „Hülle-Zellen“ bilden. „Hülle-Zellen“ sind extrem dick- und glattwandige Zellen, sie können allein oder in Ketten vorliegen. Daneben können auch Sklerotien vorhanden sein. Bei Sklerotien handelt es sich um einzelne verfestigte Hyphenverbände, welche besonders durch ihre Größe und die Einlagerung von Pigmenten auffallen. Sklerotien sind bald Fremdkörper im Myzel und können sich aus dem Verband lösen und verbreitet werden. Diese Form ermöglicht es, dass die Pilze selbst unter widrigen Bedingungen dauerhaft überleben können [1, 33, 51].

Die Gattung *Aspergillus* ist sehr groß und beinhaltet ca. 175 Arten. Einige Arten konnten mit der Entstehung einer Mykose im menschlichen Organismus in Verbindung gebracht werden, obwohl diese Pilze normalerweise andere ökologische Nischen besiedeln. Besonders *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* und *A. terreus* seien hier erwähnt [79, 83, 87, 108]. Häufig hervorgerufene Erkrankungen sind die pulmonale Aspergillose und die Sinusitis [19, 94]. Sie werden insbesondere durch *A. fumigatus* und *A. flavus* verursacht, zunehmend werden auch Fälle von invasiven *A. terreus* - Mykosen beobachtet [11, 45, 62]. Daneben können Ohrmykosen auf dem Boden einer bakteriellen Otitis externa entstehen. Diese werden zumeist durch *A. niger* hervorgerufen [7]. Auch andere Organsysteme können befallen werden, dies jedoch weitaus seltener, als ein Beispiel sei hier der Digestivtrakt genannt [42].

Insgesamt werden in der Literatur 4 Erkrankungsformen, welche durch Pilze der Gattung *Aspergillus* hervorgerufen werden können, beschrieben: Die invasive Aspergillose, die allergische bronchopulmonale Aspergillose, das Aspergillom und die Gruppe der extrapulmonalen Aspergillosen, zu welchen unter anderem die bereits genannte Sinusitis und die Otomykose zählen [65].

Abbildung 1: Schematische Darstellung von *Aspergillus* und Erklärung der morphologischen Terminologie nach de Hoog et al.



1.1.3.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist in der Umwelt weit verbreitet. Aus den verschiedensten Quellen lässt sich dieser Pilz isolieren, insbesondere häufig aus dem Erdreich und von faulenden organischen Substanzen. Aber auch in Luft und Staub ist er zu finden [28, 65]. *A. fumigatus* ist ein wichtiger Vertreter der humanpathogenen Keime. Er ist der häufigste Erreger von invasiven und nicht-invasiven Aspergillosen [21, 28, 32, 65, 83]. Bei immunkompetenten Menschen kann er als potentieller Antigen fungieren oder lokal begrenzte Infektionen der Lunge, Nasennebenhöhlen sowie anderer Körperstellen verursachen. Bei immunsupprimierten Patienten kann er nach Inhalation der Sporen invasive Infektionen der Lunge und anderer Organe

auslösen [19, 65]. *A. fumigatus* ist ein thermotoleranter Pilz und wächst somit auch bei Temperaturextremen von bis zu 55°C. Sein Temperaturoptimum liegt bei 37°C, sodass der Mensch als Wirt wie geschaffen scheint. In Kultur wächst er innerhalb einer Woche auf ca. 50mm im Durchmesser an. Die Kolonien haben eine glatt begrenzte, zumeist weiße Umrandung, wachsen flach und ihre Oberflächenstruktur ist pudrig bis filz- oder samtartig. Das Farbspektrum umfasst weiße über hellgrüne, dunkelgrüne bis hinzu rauchgraue Kolonien (**Abbildung 2**). Die Rückseite der Kultur ist cremefarben. Das mikroskopische Bild zeigt hyaline und septierte Hyphen. Die Konidiophoren sind ebenso hyalin oder grün, kurz ($\leq 300\mu\text{m}$) und glatt. Sie enden in einem kalottenförmigen Vesikel, welches einen Durchmesser von 20 bis 30 μm besitzt. *A. fumigatus* ist uniseriat. Die Phialiden besetzen die oberen 2/3 des Vesikels. Von diesen wachsen die Konidien säulenförmig aus. Die Konidien weisen eine kugelige bis halbkugelige Form auf und haben einen Durchmesser von ca. 2 bis 3,5 μm . Sie sind grün und können glatt oder leicht rau sein (**Abbildung 3**) [6, 33, 65, 93, 116].

Abbildung 2: Makroskopie von *Aspergillus fumigatus*.



Abbildung 3: Mikroskopische Fotografie von *Aspergillus fumigatus*. Die Fotografie wurde bei 400facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop erstellt.



1.1.3.2 Aspergillus flavus

Aspergillus flavus ist ein klassischer Bewohner des Erdreichs, zudem findet man ihn als Saprophyt auf pflanzlichem Material, insbesondere Getreide, Trockenobst und Gewürzen [48]. *A. flavus* wird bei invasiven Aspergillosen weitaus seltener als *A. fumigatus* isoliert, ist jedoch häufiger als dieser für eine extrapulmonale Manifestation einer invasiven Infektion verantwortlich [8, 67]. Infektionen der Nasennebenhöhlen zählen zu den häufigsten mit *A. flavus* assoziierten Krankheitsbildern [58]. Einzelne Stämme können Aflatoxine produzieren. Diese Toxine sind sowohl für Mensch, als auch Tier, hoch karzinogen. Die Kulturen wachsen bei einem Temperaturoptimum von 35 bis 37°C innerhalb einer Woche um ca. 60 mm im Durchmesser. Sie wachsen flach und ihre Oberfläche ist wollig bis körnig und oftmals zeigen sie eine radiale Furchung. Die Farbe ist initial gelb und

wandelt sich im Verlauf zu einem gelb-grün. Mikroskopisch zeigen sich lange (400 – 850 μm), hyaline, raue Konidiophoren. Das Vesikel ist kugel- oder kolbenförmig. *A. flavus* kann sowohl uniseriat, als auch biseriat auftreten und seine Metulae und Phialiden sind radiär auf der gesamten Oberfläche des Vesikels angeordnet. Insgesamt ergibt sich also eine radiäre Gestalt des Konidienkopfes. Die 3 bis 6 μm großen, grünen, rauen Konidien sind rundlich oder elliptisch (**Abbildung 4**). Wenige Stämme produzieren Sklerotien [6, 33, 48, 58, 116].

Abbildung 4: Mikroskopische Fotografie von *Aspergillus flavus*. Die Fotografie wurde bei 400facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop erstellt.



1.1.3.3 Aspergillus niger

Aspergillus niger ist ein in der Natur weit verbreiteter Pilz. Besonders in Regionen, in welchen tropisches Klima herrscht ist er häufig zu finden. Klassischerweise lässt er sich aus dem Erdboden, Staub, Umgebungsluft und auf Getreide sowie

eingelagerten Früchten und anderen Nahrungsmitteln isolieren. In der Industrie ist dieser Pilz ein bedeutender Produzent von organischen Säuren, z. B. Zitronensäure, Fumarsäure und Gluconsäure [2, 98]. Nach *A. fumigatus* und *A. flavus*, ist *A. niger* der am dritthäufigsten isolierte Erreger einer pulmonalen Aspergillose [19, 45, 62]. Daneben wird *A. niger* häufig im Rahmen einer Ohrmykose als ursächlicher Erreger isoliert [7, 59]. Die optimale Wachstumstemperatur von *A. niger* reicht von 18°C bis zu 42°C. Bei 25°C wachsen die Kolonien auf Czapek Dox Agar ca. 4 bis 5cm im Durchmesser innerhalb von 7 Tagen. Initial zeigen die Kolonien eine gelbe oder weiße Färbung, welche nach wenigen Tagen auf ihrer Oberfläche mit einer Schicht brauner bis schwarzer Konidienköpfchen bedeckt ist (**Abbildung 6**). Diese verleihen den Kolonien von *A. niger* ihre typische schwarze Farbe (**Abbildung 5**). Die Rückseite der Kolonie ist cremefarben. Mikroskopisch zeigen sich 400 bis 3000µm lange, dickwandige, hyaline oder braun pigmentierte Konidiophoren. Das Vesikel ist rund und hat in der Regel einen Durchmesser von 50 bis 100µm. *A. niger* ist biseriat. Phialiden und Metulae sind radiär auf der gesamten Oberfläche des Vesikels angeordnet, sodass der Konidienkopf in seiner Gestalt radiär erscheint (**Abbildung 7**). Die Konidien sind kugelförmig oder oval, haben eine raue Oberfläche und eine braune Färbung [6, 33, 116].

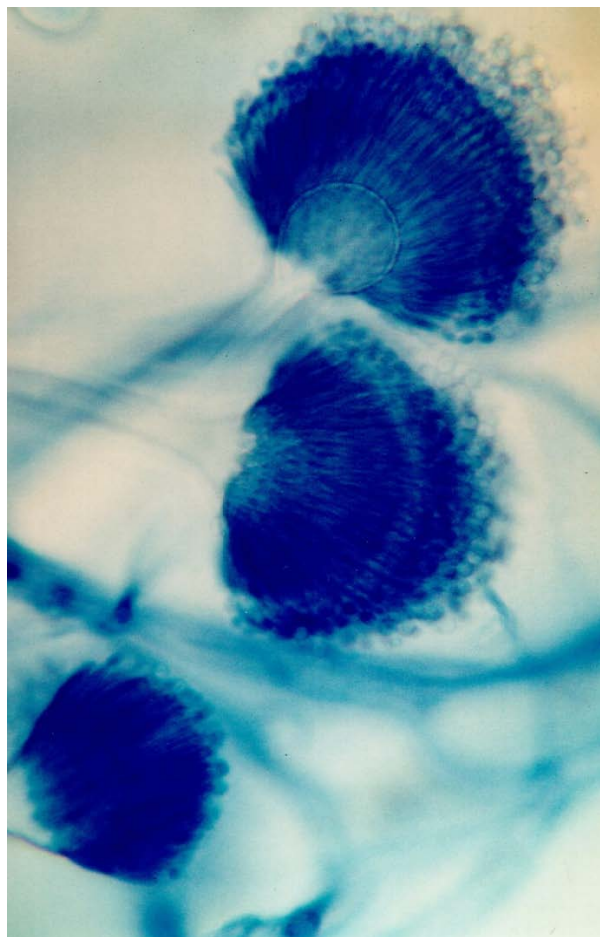
Abbildung 5: Makroskopie von *Aspergillus niger*. Braunschwarz ist *A. niger*, blau ist *A. fumigatus*, erdbraun ist *A. terreus*, Kamelhaarfarben ist *A. Paecilomyces variotii*.



Abbildung 6: Makroskopie von *Aspergillus niger*.



Abbildung 7: Mikroskopische Fotografie von *Aspergillus niger*. Die Fotografie wurde bei 400facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop erstellt.



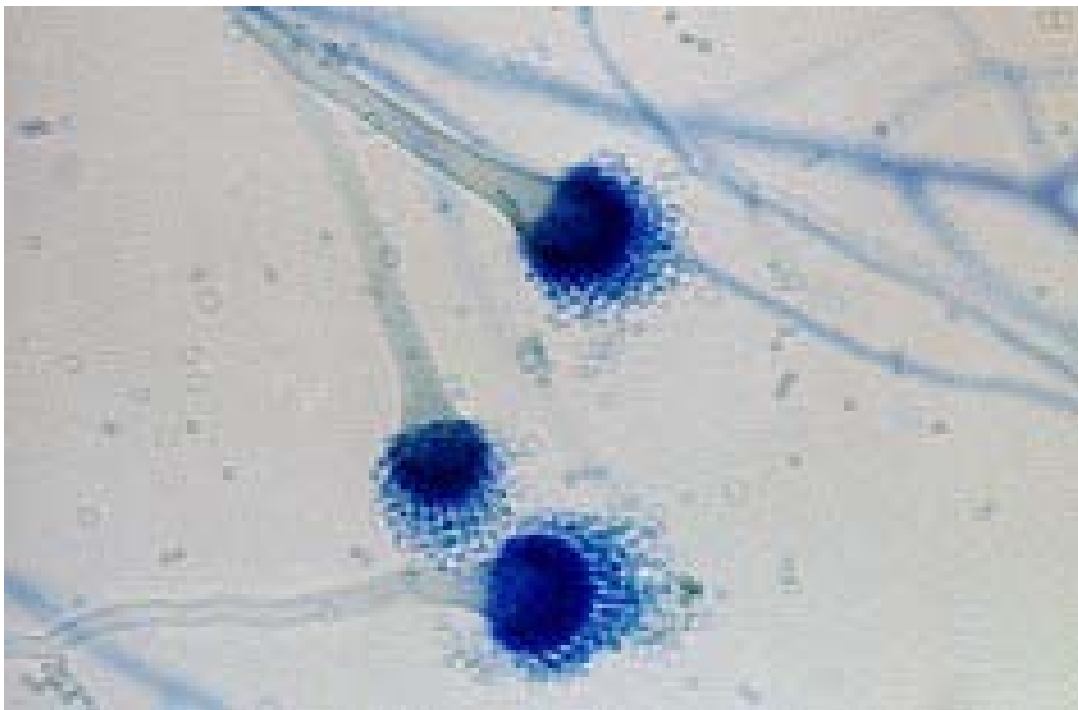
1.1.3.4 Aspergillus terreus

Aspergillus terreus kann aus dem Erdreich isoliert werden. Desweiteren ist es möglich ihn ebenso aus Waren, wie Getreide, Baumwolle, Heu und Stroh zu isolieren, insofern diese in einer feuchten Umgebung gelagert wurden. *A. terreus* ist weitaus seltener als die drei zuvor genannten Arten *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. niger* aus der Umgebungsluft zu isolieren [17, 44] und für einen geringeren Teil der invasiven Aspergillosen verantwortlich. Die Angaben zu *A. terreus* als Verursacher einer invasiven Aspergillose variieren zwischen 1% [86] über 6% bis hin zu 12% [49, 55] an diversen Klinikstandorten. Aufgrund dessen, dass einige der Stämme eine Resistenz gegenüber Amphotericin B zeigen [18, 63], ist er jedoch nennenswert und stellt ein großes Infektionsproblem für immunsupprimierte Patienten dar [12, 45, 62]. Darüber hinaus ist *A. terreus* ein Erreger von Haut- und Nagelmykosen sowie Infektionen der Augen und Ohren [7, 22] und weist ein hohes allergenes Potential auf [107]. Die Kolonien von *A. terreus* wachsen bei einer Temperatur von 25°C auf Czapek Dox Agar 3,5 bis 5cm im Durchmesser innerhalb von 7 bis 10 Tagen. Sie wachsen flach oder aber mit einer radialen Furchung. Die Oberfläche der Kulturen erscheint samtartig und zeigt manchmal einen Flaum. Die Farben reichen von gelblich-braun bis hin zu zimtbraun. Die Rückseite der Kolonien ist weiß, gelb bis blass braun (**Abbildung 8**). Das mikroskopische Bild zeigt kurze (100 - 250µm), glattwandige, hyaline Konidiophoren sowie kleine (10 - 16µm im Ø) kugelige Vesikel. *A. terreus* ist biserial. Metulae und Phialiden bedecken 2/3 der Oberfläche der Vesikel. Der Konidienkopf nimmt insgesamt eine säulenförmige Gestalt an (**Abbildung 9**). Die Konidien sind kugelförmig oder elliptisch. Zudem sind sie glattwandig und sind entweder farblos oder weisen eine zartgelbe Farbgebung auf. Desweiteren ist es manchmal möglich entlang der vegetativen Hyphen, farblose, kugelige oder ovale und relativ dickwandige Aleurokonidien zu beobachten. Diese sind charakteristisch für *A. terreus* [6, 33, 116].

Abbildung 8: Makroskopische Aufnahme von *Aspergillus terreus*.



Abbildung 9: Mikroskopische Fotografie von *Aspergillus terreus*. Die Fotografie wurde bei 160facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop erstellt.



1.2. Pilzinfektionen und ihre Einteilung

Pilzinfektionen werden basierend auf ihrer Lokalisation traditionell in 4 Hauptkategorien eingeteilt:

Superfizielle Mykosen: Diese Kategorie beinhaltet Mykosen der Hautoberfläche und Hautanhangsgebilde. Die Pilze besiedeln diese Regionen, rufen jedoch keine Immunantwort hervor. Dazu zählen beispielsweise die *Pytirisias versicolor* und die *Otitis externa* [33].

Kutane Mykosen: Hierzu zählen jene Erkrankungen, bei welchen die äußersten Schichten der Haut (Epidermis, Stratum spinosum, Stratum corneum), der Schleimhaut, der Genitalien und des äußeren Ohres mit Pilzen befallen sind. Ebenso kann auch totes Gewebe befallen sein. Die *Tinea pedis* und die *Tinea capitis* seien hier als Beispiele genannt [33].

Subkutane Mykosen: Zu den subkutanen Mykosen zählen lokalbegrenzte, primäre Infektionen der Subkutis. Hierbei wird eine Immunantwort ausgelöst. Daran beteiligt sind insbesondere Leukozyten und eosinophile Granulozyten, welche häufig zu einer Entstehung von Zysten und Granulomen führen [33].

Tiefe Mykosen: Die tiefen Mykosen werden nach Ihrer Lokalisation in systemische Mykosen (auf ein Organ oder Gewebe begrenzt) und disseminierte Mykosen eingeteilt [33].

1.3 Die Aspergillose

Der Begriff der Aspergillose umfasst jegliche Formen der Erkrankung bei Mensch und Tier, welche durch *Aspergillus* spp. insbesondere *Aspergillus fumigatus*, verursacht werden. Zumeist befallene Organsysteme sind Haut und Schleimhaut, Lunge, ZNS, Augen, Nasennebenhöhlen und Urogenitaltrakt. Infektionen anderer Organe durch *Aspergillus* spp. sind nicht ausgeschlossen, aber weitaus seltener [19, 20].

1.4 Systemische Aspergillosen

Zu den systemischen Aspergillosen gehört eine Vielfalt klinischer Bilder, ausgelöst durch eine allergische Reaktion, Kolonisation oder Infiltration durch verschiedene *Aspergillus species*. Insbesondere immunsupprimierte Patienten sind betroffen.

Aspergillom: Ein Aspergillom bezeichnet eine kolonisierte Form der Aspergillose in einer bereits bestehenden Körperhöhle. Hierbei können einerseits die Nasennebenhöhlen, andererseits die Lunge befallen sein. Bronchiektasien, Emphysem-Bullae oder eine Erkrankung an Tuberkulose mit Kavernenbildung können zur Entstehung präformierter Höhlen beitragen. Der Pilz bildet in diesen Höhlen einen kompakten Myzelball, angrenzendes Gewebe invadiert er nicht [33].

Invasive Aspergillose: Der Respirationstrakt stellt eine bedeutende Eintrittspforte für Pilzsporen dar. Durch die Inhalation von Pilzsporen ist die Lunge zumeist der Hauptmanifestationsort der invasiven Aspergillose. Das Myzel wächst zwischen den Epithelzellen und kann sich nach Anschluss an das Gefäßsystem im Organismus ausbreiten. Klinisch zeigt sich eine akute Pneumonie mit hohem Fieber und Dyspnoe. In der konventionellen Röntgenaufnahme können kleinere Infiltrate zu sehen sein. Eine frühe Diagnose ist schwer zu stellen, die Letalitätsrate ist hoch [33].

Toxische Aspergillose: Diese Form der Aspergillose tritt nach einer massiven Inhalation von *Aspergillus*-Konidien auf. Klinisch äußert sie sich in einer akut einsetzenden Dyspnoe. Die Symptomatik ist von kurzer Dauer und bildet sich ohne Residuen zurück [33].

Asthmatische Aspergillose: Eine wiederholte Exposition gegenüber *Aspergillus*-Konidien führt zu einer Bildung spezifischer IgE-Antikörper und eosinophiler Granulozyten. Bei erneuter Exposition kommt es zu einer akuten, allergischen bronchokonstriktischen Reaktion. Diese dauert nicht lange an, tritt jedoch rezidivierend bei erneuten Expositionen auf [33].

Infiltrative alveoläre Aspergillose: In diesem Fall kommt es bei den betroffenen Patienten zu einer Dyspnoe, welche durch das (multi)lokale Auswachsen inhalierter *Aspergillus*-Konidien hervorgerufen wird. Hierbei kommt es nicht zu einer Infiltration des Lungenparenchyms, jedoch zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion [33].

Allergische bronchopulmonale Aspergillose: Die allergische bronchopulmonale Aspergillose stellt eine Kombination der asthmatischen Aspergillose und der infiltrativen alveolären Aspergillose dar. Sie vereint die Merkmale der anderen beiden Aspergilloseformen [33].

Zerebrales Aspergillom: Das zerebrale Aspergillom stellt eine Komplikation der durch *Aspergillus species* verursachten Sinusitis dar. Der Pilz gelangt durch hämatogene Dissemination in das Gehirn [33].

1.5 Die invasive Aspergillose im Detail

1.5.1 Der Pathomechanismus der invasiven Aspergillose

Aspergillus spp. sind ubiquitär in der Umwelt (Luft, Wasser) vorkommende Mikroorganismen, deren Konidien mit der Luft oder dem Leitungswasser regelmäßig inokuliert werden können [80-82]. Die Eintrittspforte beim Menschen stellt also in erster Linie der Respirationstrakt dar. Die meisten Menschen atmen *Aspergillus*-Konidien tagtäglich in großer Zahl ein, ohne an einer Aspergillose zu erkranken. Wie viele Konidien schließlich eingeatmet werden müssen, um zu erkranken, ist bisher nicht bekannt [28, 43, 54].

Beim immunkompetenten Menschen tragen in erster Linie die Komponenten der unspezifischen Immunität dazu bei, eine invasive Infektion zu verhindern. Dazu zählen die anatomischen Barrieren des Respirationstraktes mit Flimmerepithel, Mucus und Surfactant sowie das Komplementsystem und die Alveolarmakrophagen. Dabei kommt den Alveolarmakrophagen die größte Bedeutung zu, da *Aspergillus* spp. mittels seiner zahlreichen Virulenzfaktoren (**Tabelle 1**) durchaus dazu in der Lage ist, insbesondere die anatomischen Barrieren außer Kraft zu setzen. *A. fumigatus* sei hier als Beispiel genannt. Adhesine helfen dem Pilz mit den Proteinen und Zellen des Wirtes zu interagieren, zum Beispiel mit Fibrinogen [103, 105]. Es konnte weiterhin herausgefunden werden, dass pigmentierte Stämme von *A. fumigatus* pathogener sind, als nicht pigmentierte, da sie die Phagozytose der Konidien inhibieren können [65]. Toxische Moleküle können Wirtszellen abtöten und lysieren sowie zu einer Immunsuppression führen. Sie helfen dabei die Infektion zu etablieren, aufrecht zu erhalten und weiter voranzutreiben [3, 9, 40, 41]. Schließlich

sind diverse Enzyme, insbesondere Proteasen, essenziell für die Invasion des Pilzes in das Wirtsgewebe [78]. Siehe hierzu auch die folgende Tabelle [65, 66]:

Tabelle 1: Virulenzfaktoren von *A. fumigatus* nach Latgé [65].

Kategorie	Funktion in vivo	Molekül
Adhesine	Förderung der Interaktion von Wirtsproteinen und -zellen mit <i>A. fumigatus</i>	Komplementrezeptor (54-58 kDa)
		Lamininrezeptor (72kDa)
		Hydrophobine (14 und 16 kDa)
Pigmente	Inhibition der Phagozytose der Konidien	Dihydroxynaphthalen-Melanin
toxische Moleküle	Tod der Wirtszelle	RNAse (18kDa)
	Lyse der Erythrozyten	Hämolysin (30kDa)
	Immunsuppression	sekundäre Metaboliten, z.B. Gliotoxin
Enzyme	Förderung der Besiedlung der Lungenmatrix und/oder Abbau humoraler Faktoren	Serinprotease (33kDa)
		Aspartprotease (38kDa)
		Metalloprotease (40kDa)
		Dipeptidylpeptidasen (88 und 94 kDa)
	Antioxidantien während der Phagozytose	Katalasen (350kDa und unbekannt),
		Superoxiddismutasen (27 und 67 kDa)
	Schädigung des Epithels	Phospholipase(n)

1.5.2 Patientenbezogene Risikofaktoren

Es existiert eine Vielzahl von patientenbezogenen Risikofaktoren, welche prädisponierend für eine invasive Aspergillose sein können. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um ein multifaktorielles Problem, da häufig mehrere Risikofaktoren zusammenkommen können. Folgende Patientengruppen sind gefährdet an einer invasiven Aspergillose zu erkranken:

- Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mit einer verlängerten Phase der Neutropenie oder unter Kortikosteroidtherapie zur Therapie der Graft versus Host Disease (GvHD);
- Patienten nach autologer Stammzelltransplantation oder Organtransplantation, die mehr als 2 Wochen neutropen waren;
- Patienten, welche im Rahmen einer intensiven Chemotherapie eine lange Phase der Neutropenie entwickeln;

- Patienten die infolge einer hämatologischen Neoplasie oder soliden Tumorerkrankung eine Immunsuppression aufweisen, welche nicht durch eine Chemotherapie verursacht wurde;
- Patienten, die bereits an einer Aspergillose erkrankt waren und erneut eine Chemotherapie oder Stammzelltransplantation bekommen sollen;
- Patienten mit einer aplastischen Anämie;
- Patienten mit AIDS;
- Patienten mit einem angeborenen Immundefekt.

Weitere generelle Risikofaktoren für die Entstehung einer invasiven Pilzinfektion können Polytrauma, Unterernährung, Leberzirrhose, Pankreatitis, Dialyse, eine Therapie mit Antibiotika, ausgedehnte Verbrennungen, längerfristige künstliche Beatmung sowie ein längerer Aufenthalt auf der Intensivstation sein [19, 24-27, 65, 72-74, 83, 97, 99].

1.5.3 Diagnostik der invasiven Aspergillose

Obwohl derzeit bereits einige Informationen zum Pathomechanismus der invasiven Aspergillose vorliegen und immer mehr über die Virulenzfaktoren bekannt wird, bleibt es schwer, die Diagnose einer invasiven Aspergillose zu stellen, insbesondere in den Anfangsstadien der Erkrankung. Wie bei den anderen Formen der Aspergillose, so zählen in erster Hinsicht auch Fieber, Brustschmerz, Husten, Dyspnoe, Gewichtsverlust und Unwohlsein zu den Hauptsymptomen der invasiven Aspergillose. Diese Symptome sind alle sehr variabel und unspezifisch. Ebenso ist weiterbestehendes Fieber $>38,5^{\circ}\text{C}$ unter einer antibakteriellen Therapie, nicht länger als Kriterium für den Beginn einer antimykotischen Therapie annehmbar, da eine Kortikosteroidtherapie bei Patienten mit einer invasiven Aspergillose einen Temperaturanstieg verhindern kann [89, 92].

Grundsätzlich sollte möglichst frühzeitig bei ersten Zeichen einer Infektion mit der Diagnostik begonnen werden. Bewiesen werden kann eine invasive Aspergillose nur durch die Histologie oder durch eine Kultur aus einer physiologischen, steril gewonnen Patientenprobe, dies könnte auch eine Blutprobe sein. Im klinischen Alltag gelingt die Anzucht von *Aspergillus* spp. aus Blutproben jedoch selten. Kulturelle Diagnostik und mikroskopische Untersuchung von Proben aus dem

Respirationstrakt, welche mittels Bronchiallavage gewonnen werden konnten, Sputum oder Sinuslavagen sind umstritten, weil *Aspergillus* spp. ubiquitär in der Umgebung vorkommt und somit eine Kontamination von Proben nicht unwahrscheinlich ist. Zudem ist es in der kulturellen Diagnostik nicht möglich zwischen der zuvor genannten Kontamination, Besiedlung oder Infektion zu unterscheiden [23, 38]. Da eine Vielzahl der betroffenen Patienten zusätzlich zur Immunsuppression eine Thrombozytopenie aufweist, sind invasive Verfahren zur Gewinnung von Probenmaterial (Biopsie) oft nicht möglich und es muss auf indirekte, nicht invasive Nachweisverfahren zurückgegriffen werden. Hierzu gehören die bildgebenden Verfahren. Am Anfang steht hier die Thoraxübersichtsaufnahme in zwei Ebenen, auch wenn die Beurteilbarkeit der Thoraxübersicht durch Überlagerungen oft sehr begrenzt ist. Vierzig bis 50% der Übersichtsaufnahmen, welche zur Pneumoniesuche bei hämatoonkologischen Patienten angefertigt werden sind falsch negativ [50, 84]. Um eine Pneumonie sicher auszuschließen ist die Thoraxübersichtsaufnahme also nicht geeignet. Bei weiter bestehendem Verdacht sollte eine Computertomographie (CT) durchgeführt werden. Sie ist die Methode der Wahl. Pneumonien werden mit der CT früher diagnostiziert und auch ihre Sensitivität und Spezifität sind gegenüber einer Röntgenaufnahme signifikant höher [57, 84]. Die CT gibt therapierelevante Informationen: Die Ausdehnung der Infiltrate kann beurteilt werden; die Infiltrate können charakterisiert und Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Erreger gemacht werden; andere Differentialdiagnosen können erstellt, bestätigt oder ausgeschlossen werden. Das allgemeine Standardverfahren zur Darstellung der Lunge ist die Spiral-CT, daneben gibt es noch die high-resolution CT (HRCT) und die Multislice-CT. Die Magnetresonanztomographie (MRT) liefert zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung vergleichbare Befunde wie die CT [69]. Erfahrungen über die Verwendung der MRT in der Früherkennung einer invasiven Aspergillose bestehen bisweilen nicht.

Neben den apparativen Verfahren existieren laborchemische und molekularbiologische Verfahren für die Diagnostik der invasiven Aspergillose: Für die Detektion von *Aspergillus*-Antigen im Serum oder Liquor des Patienten steht ein „sandwich enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) zur Verfügung [75]. Dieser Test zur Detektion von Galactomannan-Antigen, einem Bestandteil der Zellwand von *Aspergillus* spp. weist eine Spezifität von 98% und eine Sensitivität von 90% für die Diagnose einer invasiven Aspergillose auf [71]. PCR-Assays, welche Methoden der

Molekularbiologie darstellen und dem Nachweis von Pilz-DNA dienen, werden immer häufiger für diagnostische Zwecke verwendet. Die Real-time-PCR kann neben der Detektion von Pilz-DNA auch zu deren Quantifizierung innerhalb weniger Stunden herangezogen werden. Ebenso werden auch Verfahren zum Nachweis von Antikörpern herangezogen [31, 39, 53, 91]. Es folgt, dass nur eine Kombination mehrerer Testverfahren, zusammen mit klinischen Parametern und bildgebenden Verfahren den Nachweis einer invasiven Aspergillose ermöglicht.

1.5.4 Definition einer invasiven Mykose nach den Kriterien der EORTC/MSG

Die “European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group” (EORTC) und “ The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group” (MSG) veröffentlichten 2005 eine neu überarbeitete Definition invasiver Mykosen. Mittels dieser Definition wird invasiven Mykosen in immunsupprimierten Patienten oder Patienten nach humaner Stammzelltransplantation (HSZT) jeweils ein Grad einer Wahrscheinlichkeit zugeteilt (**Tabelle 2**). Diese ist von diversen Kriterien, welche später aufgeführt werden sollen, abhängig. Insgesamt enthält die Definition drei Wahrscheinlichkeitsgrade: Verwendung finden die Bezeichnungen „proven“, „probable“ oder „possible invasive fungal disease“. Zu Deutsch *bewiesene*, *wahrscheinliche* oder *mögliche invasive Mykose* [35].

Die *bewiesene* invasive Mykose liegt vor, wenn in der mikroskopischen Analyse sterilen Materials und in einer Kultur, der Pilznachweis gelungen ist. Für Hefen, insbesondere *Cryptococcus* spp. zählt auch der Nachweis von *Cryptococcus*-Antigen im Colony Stimulating Factor (CSF) in der serologischen Analyse. Diese Form der invasiven Mykose kann jedem Patienten unabhängig von seinem Immunstatus zugeordnet werden, d. h. patientenbezogene Risikofaktoren spielen zwar für die Entstehung der invasiven Mykose eine Rolle, jedoch nicht für die Zuteilung des Wahrscheinlichkeitsgrades „*bewiesen*“ [35].

Um eine *wahrscheinliche* invasive Mykose handelt es sich bei Vorliegen mindestens eines sogenannten Wirtsfaktors, eines klinischen Kriteriums sowie einem mykologischen Nachweis. Der Wirtsfaktor dient als Oberbegriff für die patientenbezogenen Risikofaktoren, wie zum Beispiel eine verlängerte

Neutropeniephase. Als Beispiele für klinische Kriterien seien eine disseminierte Candidiasis und eine Tracheobronchitis sowie eine sinunasale Infektion genannt. Zum mykologischen Nachweis dienen direkte und indirekte diagnostische Verfahren. So zählt beispielsweise der Nachweis von Galactomannan-Antigen im Serum als positiver mykologischer Nachweis.

Liegen nur mindestens ein Wirtsfaktor und ein klinisches Zeichen vor, so ist von einer *möglichen* invasiven Mykose auszugehen.

Ausgeschlossen von dieser Definition sind endemische Mykosen, zu welchen beispielsweise die Histoplasmose, Blastomykose sowie Kokzidioidomykose und andere mehr zählen [35].

Tabelle 2: Kriterien der EORTC/MSG für invasive Mykosen (2005).

Die Kriterien der EORTC/MSG im Detail:		bewiesene IM	wahrscheinliche IM	mögliche IM
mikroskopische Analyse	histopathologische, zytopathologische oder direkte mikroskopische Beurteilung von sterilem Material, das mittels Feinnadelpunktion oder Biopsie gewonnen wurde	mind. 1 pos. Nachweis		
Kultur	Kultur aus steril gewonnenem Material; BAL und Urin ausgeschlossen	mind. 1 pos. Nachweis		
Serologie	nur bei Kryptokokkose: Nachweis von Antigen in CSF			
Wirtsfaktor	Neutropenie > 10 Tage (Neutrophile abs. $<0,5 \times 10^9/L$) HSZT Kortikosteroidtherapie (mind. 0,3 mg/kg/Tag eines Prädnisolonäquivalent > 3 Wochen) Therapie mit T-Zellimmunsuppressiva (z. B. TNF- α -Blocker) > 90 Tage genetisch bedingter oder schwerer Immundefekt		mind. 1 Kriterium	mind. 1 Kriterium
klinische Kriterien	Pilzerkrankung im unteren Respirationstrakt, Tracheobronchitis, sinunasale Infektion, ZNS- Infektion, disseminierte Candidiasis		mind. 1 Kriterium	mind. 1 Kriterium
mykologischer Nachweis	direkte Nachweisverfahren (Zytologie, Mikroskopie, Kultur...) und indirekte Nachweisverfahren (Nachweis von Antigen oder Zellwandbestandteilen, z. B. Galactomannan Antigen Nachweis im Serum)		mind. 1 pos. Nachweis	

1.5.5 Therapiemöglichkeiten der invasiven Aspergillose

Die Letalität der unbehandelten invasiven Aspergillose liegt annähernd bei 100% [75]. Obwohl es keine Studien gibt, welche sich mit dem optimalen Beginn einer Behandlung auseinander setzen, so wird doch allgemein anerkannt, dass ein möglichst früher Therapiebeginn mit systemischen Antimykotika zu besseren

Überlebensraten führt, als ein verspäteter Beginn [37]. Selten kann eine invasive Aspergillose bewiesen werden, daher ist es entscheidend für das Überleben der Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine invasive Aspergillose, schon bei den ersten klinischen Zeichen und Symptomen mit der antimykotischen Therapie zu starten. In den letzten 10 Jahren haben sich verschiedene Therapieansätze herauskristallisiert: empirische antimykotische Therapie, präventive antimykotische Therapie und gezielte antimykotische Therapie. Die empirische Therapie ist für Patienten mit persistierendem Fieber unter Therapie mit Breitspektrum-Antibiotika und ohne weitere Zeichen einer invasiven Aspergillose gedacht. Patienten, welche ein hohes Risiko haben an einer invasiven Aspergillose zu erkranken, erhalten präventiv systemische Antimykotika, welche insbesondere gegen *Aspergillus* spp. gerichtet sind. Dies sind zum Beispiel Patienten, welche eine aggressive Chemotherapie oder eine allogene Stammzelltransplantation erhalten. Die gezielte antimykotische Therapie findet seltener Anwendung, da die Anzahl der nach EORTC/MSG-Kriterien als „proven“ diagnostizierten invasiven Aspergillosen eher gering ist [75, 90].

Zur Therapie standen bisher Polyene, Azole und Nucleosid-Analoga zur Verfügung.

Polyene, wie Amphotericin B, binden an Ergosterol, welches in der zytoplasmatischen Membran der Pilzzelle gebunden ist. Durch die Bindung entstehen Poren in der Zytoplasmamembran, wodurch diese ihre Funktion einbüßt und die Zelle schließlich stirbt.

Azole, wie zum Beispiel Voriconazol, hemmen die Synthese des Ergosterols, sodass das Zellwachstum gehemmt wird.

Nucleosid-Analoga, wie Flucytosin, hemmen die Protein- und die DNA-Synthese der Pilzzellen.

Eine neuerlich eingeführte Substanzklasse sind die Echinocandine. Sie hemmen die β -(1,3)-D-Glucansynthese und zerstören somit die Zellwand, welche spezifisch für Pilzzellen ist. In der Folge sterben die Pilzzellen ab.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die invasive Aspergillose ist zu einem der Hauptgründe für die Morbidität und Letalität immunsupprimierter Patienten geworden [4, 36]. *Aspergillus fumigatus* ist bei Vorliegen der invasiven Aspergillose der am häufigsten isolierte Pilz, gefolgt von *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus terreus* [19, 20, 45, 62, 64]. *Aspergillus terreus* im Einzelnen weist sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eine Resistenz gegen Amphotericin B (AmB) auf und gibt damit Grund zur Sorge für die Therapie infizierter Patienten [45, 101]. *A. terreus* ist im Allgemeinen in der Minderheit der Fälle für eine invasive Aspergillose verantwortlich, jedoch schwankt die Inzidenz an unterschiedlichen Klinikstandorten von 1% [86] über 6% bis hin zu 12% [49, 55]. Nicht nur die Angaben zur Inzidenz der invasiven Aspergillose unterscheiden sich von Standort zu Standort, sondern auch für die Häufigkeitsverteilung der vier genannten Aspergillusarten gibt es regionale Unterschiede. Es wird bisweilen angenommen, dass die Belastung der Umwelt, Gattung und Verteilung der Pilze und auch die Inzidenz der invasiven Aspergillose von diversen äußeren Faktoren abhängig ist, so zum Beispiel von Jahreszeit, Windgeschwindigkeit, Temperatur und Luftfeuchtigkeit [17, 56, 70]. Die Erhebung epidemiologischer Daten spielt folglich eine wichtige Rolle für die Beurteilung einer Korrelation zwischen der Anzahl der in der Umgebungsluft befindlichen Pilze und dem Auftreten einer invasiven Aspergillose.

In dieser Studie sollen für eine Periode von 12 Monaten, im Zeitraum Dezember 2007 bis einschließlich November 2008, Luftmessungen an kritischen Expositionspunkten innerhalb sowie außerhalb der Uniklinik Köln durchgeführt sowie die in ausgewählten Fachbereichen stationär behandelten Patienten auf *Aspergillus* spp. mittels Nasenabstrich untersucht werden.

Es sollen Daten gesammelt werden, welche dazu beitragen die Epidemiologie von *A. terreus* sowie *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. niger* an der Uniklinik Köln zu verstehen. Solche Daten wurden bislang nicht erhoben.

Es sollen zunächst die Luft- und Patientenisolate identifiziert und quantifiziert werden. *A. terreus* Isolate sollen kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt einer molekulargenetischen Untersuchung unterzogen werden. Daneben sollen meteorologische Daten gesammelt werden.

2.Fragestellung

Welche Aussagen können über die Epidemiologie von *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. niger* in der Uniklinik Köln und ihrer näheren Umgebung getroffen werden?

Im Einzelnen ergeben sich daraus folgende Fragen:

1. Kann *A. terreus* aus der Luft innerhalb und außerhalb des Bettenhauses der Uniklinik Köln isoliert werden?
2. In welcher Konzentration treten *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. niger* auf?
3. Wie unterscheiden sich die Konzentrationen im Innenraum und in der Außenluft?
4. Welche Besonderheiten ergeben sich für das Foyer des Bettenhauses der Uniklinik Köln?
5. Werden auf der Isolierstation, auf welcher sich die Patienten vor und nach einer Knochenmarktransplantation befinden, weniger Pilze isoliert und führt die Isolation somit zu einer Keimreduzierung?
6. Gibt es auf der Station Unterschiede für die Anzahl der isolierten KBE/m³ zwischen den einzelnen Messpunkten?
7. Welchen möglichen Ursprung gibt es für Pilzsporen, welche im Bettenhaus isoliert wurden?
8. Sind Patienten, welche stationär in der hämatoonkologischen Klinik behandelt werden häufig mit *Aspergillus* spp. besiedelt?
9. Wie viele invasive Aspergillosen treten während des 12-monatigen Studienzeitraumes auf?
10. Entwickeln besiedelte Patienten eine invasive Aspergillose?
11. Entwickeln negativ getestete Patienten eine invasive Aspergillose?
12. Ist ein Nasenabstrich aus dem vorderen Nasenabschnitt für ein Screening der Patienten hinsichtlich einer Besiedlung mit *Aspergillus* spp. geeignet?
13. Wie sinnvoll ist ein Screening der Patienten und welche Konsequenzen könnte ein positiver Abstrich haben?
14. Welche Beobachtungen ergeben sich für die meteorologischen Parameter (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Windgeschwindigkeit, Taupunkt, Luftdruck) im Jahresverlauf?

15. In welchem Zusammenhang stehen Konzentration von *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. niger* und die meteorologischen Parameter? Gibt es jahreszeitliche Schwankungen?
16. Handelt es sich bei den isolierten Stämmen von *A. terreus* um Stämme eines Klons oder besteht unter den Stämmen eine genetische Vielfalt?
17. Liefert die rep-PCR ein vergleichbares Ergebnis zur RAPD-PCR?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

- Agarose (genXpress, Wiener Neudorf, Österreich)
- Aqua dest. (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland)
- Ethanol 80% (Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland)
- Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser) für die Elektrophorese (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Glycerin – wasserfrei zur Synthese (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Größenmarker für Gelelektrophorese (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Immersionsöl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Lactophenolblaulösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Magermilchpulver (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Puffer für Nukleinsäureproben für Gelelektrophorese (Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Wien, Österreich)
- Wasser – RNasefrei für PCR (Charles River Endosafe, Sulzfeld, Deutschland)

3.1.2 Gerätschaften und Zubehör

- Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer für DiversiLab System (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)
- Gelatine Einwegfiltereinheiten, steril (Sartorius stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Gelatine Planfilter, steril (Sartorius stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Inkubator (Heraeus instruments, Osterode, Deutschland)
- Luftkeimsammler AirPort MD8 (Sartorius stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Luftkeimsammler MD8 airscan® (Sartorius stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland)

- Microfluidics LabChip Accessories für DiversiLab System (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)
- Microfuge® 18 Microcentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)
- Mikroskop (Carl Zeiss AG, Deutschland)
- Pipetten, Eppendorf Reference®, variabel (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Thermoblock Uno II (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Vortex ZX3 (Velp Scientifica, Uckfield, Großbritannien)
- Vortex Genie 2® (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA)
- Vortex–Adapter für Vortex Genie 2® (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA)
- Werkbank (Heraeus instruments, Osterode, Deutschland)

3.1.3 Kits und Inhalte

Diversilab Aspergillus Kit (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)

- rep–PCR MM1
- Primer Mix
- Ampli Taq DNA Polymerase

DiversiLab strain typing, lab chip devices (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)

- Lab chip device
- DNA Ladder
- DNA Marker 150bp und 7000bp
- DNA Dye Concentrate
- DNA Gel Matrix
- Spin Filter

DNeasy Blood and Tissue Kit (250) (Qiagen, Hilden, Deutschland)

- DNeasy Mini Spin Columns (colorless) in 2 ml Collection Tubes
- 2 ml Collection Tubes
- Puffer ATL
- Puffer AL
- Puffer AW1 *
- Puffer AW2 *
- Puffer AE
- Proteinkinase K

* Puffer AW1 und Puffer AW2 lagen in konzentrierter Form vor. Vor Gebrauch wurde Ethanol (96–100%) nach entsprechender Beschreibung auf der Flasche hinzugefügt.

Mo Bio Ultra Clean (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA)

- Microbial DNA MicroBead Tubes (contain 250mg MicroBeads)
- Microbial DNA MicroBead Solution
- Microbial DNA Solution MD1 (Lysepuffer)
- Microbial DNA Solution MD2 (Lysepuffer)
- Microbial DNA Solution MD3 (Lysepuffer)
- Microbial DNA Solution MD4 (Ethanol-Waschlösung)
- Microbial DNA Solution MD5 (Elutionspuffer)
- Microbial DNA Spin Filters (für 2 ml Collection Tubes)
- Microbial DNA Collection Tubes, 2ml

Ready to go RAPD Analysis Beads (GE Healthcare, Wien, Österreich)

- RAPD analysis beads – Raumtemperatur stabile Kugel, welche Puffer [3mM MgCl_2 , 30mM KCl und 10mM Tris, (ph 8,3)], dATP (0,4mM), dCTP (0,4mM), dGTP (0,4 mM), dTTP (0,4mM), bovines Serumalbumin (BSA) (2,5 μg) sowie AmpliTaqTM DNA-Polymerase enthält; für RAPD Analyse.

3.1.4 Kulturmedien

- Sabouraud–Flüssigmedium (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)
- Sabouraud–Gentamicin–Chloramphenicol–2–Agar (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)
- Malzextrakt Agar mit Chloramphenicol (Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Deutschland)

3.1.5 Primer

- C II (5′-GCGCACGG-3′)
- P 4 (5′-GATAGATAGATA-3′)
- R 108 (5′-GTATTGCCCT-3′)

3.1.6 Software

- Acrobat Professional 7 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland)
- CorelDRAW X3 (Corel, Unterschleißheim, Deutschland)
- Endnote X2® (Thomson Reuters, New York, USA)
- Microsoft Office 2007 (Microsoft Excel, Microsoft Powerpoint, Microsoft Word; Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland)
- SigmaPlot 10 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland)
- SPSS Software (SPSS, version 16.0, SPSS; Chicago, IL)
- GraphPad Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA USA)

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

- Abstrichtupfer neutral, Stabmaterial aus Plastik, Länge 135mm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Deckgläser 24 x 24mm, Stärke 1 (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland)
- Einmal-Impfösen, steril, Volumen: 10µl (VWR International, Darmstadt, Deutschland)
- Etest® (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland)
- Impfnadeln, steril (VWR International, Darmstadt, Deutschland)
- Lagerkasten mit Deckel und Rastereinsatz für Mikro-Röhren (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Microbank® System (Inverness medical, Köln, Deutschland)
- Mikro-Schraubröhre 2ml, PP, flach, mit montiertem Verschluss, steril (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Objektträger mit Mattrand (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland)
- Parafilm® (American National Can GmbH & Co. KG, Gelsenkirchen, Deutschland)
- PCR Tubes, 0,2ml (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland)
- PCR Tube Strips (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Pipettenspitzen 1000µl (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Reagiergefäße, 1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Reagiergefäße, 2ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Transferpipette 6ml, Länge 146mm, Tropfengröße 20 30µl, einzeln steril verpackt (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen, 15ml, steril (VWR International, Darmstadt, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Luftproben

3.2.1.1 Orte der Luftprobengewinnung

Die für die Beobachtungen relevanten Stationen waren jene, welche sich insbesondere mit der Betreuung immunsupprimierter Patienten befassen. Dazu zählten die Schwerpunkte Hämatologie und Onkologie, welche sich im Bettenhaus der Uniklinik Köln zu einem Teil auf der Station 13 befanden. Zudem sollte auch die Aspergilluskonzentration im Bereich der Eingangshalle des Bettenhauses, bestimmt werden. Dort war aufgrund der Bauweise des Foyers, welches ein großflächiges Glasdach besitzt, und der Anpflanzung natürlicher Pflanzen, ein anderes Aufkommen von Schimmelpilzen zu vermuten, als im gewöhnlichen Außen- und Innenbereich des Klinikums. Weitere interessante Messpunkte außerhalb der Gebäude des Klinikums stellten der viel besuchte Patientengarten und die Umgebung rund um das Bettenhaus dar, da zum angegebenen Zeitpunkt Baumaßnahmen, sowohl am Bettenhaus selbst, als auch in dessen Umgebung stattfanden.

Insgesamt gab es eine Anzahl von 8 definierten Messpunkten für die genannten Bereiche. Fünf der Messpunkte befanden sich auf Station 13, ein Messpunkt im Foyer und schließlich 2 im Außenbereich, wobei, einer davon im Patientenpark und der andere in der Nähe des Mildred-Scheel-Hauses lokalisiert waren. Die 5 Messpunkte auf Station 13 waren wie folgt verteilt. Jeweils ein Messpunkt befand sich vor den Personen- und Bettenaufzügen und ein weiterer Messpunkt im Bereich des Materialwarentransportes, welcher einen singulären Raum mit insgesamt 3 Aufzügen darstellt, über welche die Wäsche, Verbrauchsmaterialien und Nahrungsmittel die Station erreichen sowie Abfälle diese verlassen. Der vierte Punkt befand sich auf Station 13b kurz vor dem Stationszimmer und der fünfte Punkt befand sich auf dem Gang der Station 13c, bei welcher es sich um die Isolierstation für humane Stammzelltransplantationen handelt. Näheren Aufschluss sollen folgende Schemazeichnung (**Abbildung 10**) und Tabelle (**Tabelle 3**) geben.

Tabelle 3: Bezeichnung der Messpunkte und entsprechende Ortsbeschreibung.

Mp 1 a, b, c	Nahe Zentrallager, Müllentsorgung und Mildred Scheel Haus
Mp 2 a, b, c	Patientengarten
Mp 3 a, b, c	Foyer
Mp 4 a, b, c	Eb 13 vor Personenaufzügen
Mp 5 a, b, c	Eb 13 vor Bettenaufzügen
Mp 6 a, b, c	Eb 13 Materialwarentransport
Mp 7 a, b, c	Eb 13b Gangaufzweigung nahe Stationszimmer
Mp 8 a, b, c	Eb 13c Gang KMT-Station

Abbildung 10: Grundriss Bettenhaus Ebene 13. Die Messpunkte sind gelb hervorgehoben und mit einem Pfeil sowie einer entsprechenden Bezeichnung versehen.



3.2.1.2 Vorgang der Luftprobengewinnung

Es wurden einmal pro Woche Luftproben in den oben genannten potentiellen Risikobereichen/-räumen, innerhalb und außerhalb des Klinikgebäudes gesammelt. Die Probengewinnung innerhalb des Gebäudes, insbesondere auf den Stationen fand während der normalen Klinikaktivität, sprich der Versorgung der Patienten und Ausführung der pflegerischen Tätigkeiten, statt. Die Luftproben wurden im Außenbereich und im Foyer mithilfe des Luftkeimsammlers *AirPort MD8* und auf der Station mithilfe des Luftkeimsammlers *MD8 airscan®* der Firma *Sartorius stedim Biotech GmbH* gewonnen. Für die Messungen im Innenraumbereich musste das zweite Gerät herangezogen werden, da ersteres nicht für eine lang andauernde Nutzung ausgelegt war. Beide Geräte wurden mit sterilen Gelatine Planfiltereinheiten, welche auf einem entsprechenden Filterhalter angebracht waren, bestückt. Während jeder Probengewinnung befand sich das Gerät ca. 1 Meter über dem Boden, so dass der Versuchsaufbau an jedem Ort und zu jeder Zeit gleich und somit einfach zu wiederholen war. Es wurden jeweils drei Einzelproben Luft bei jeder Stichprobengewinnung gesammelt. Das gesammelte Volumen betrug je Messung 400 Liter. Eine Messung dauerte bei einer Saugleistung von 50L in der Minute ca. 8 Minuten, womit sich für die Durchführung der gesamten Messungen, einschließlich Zurücklegen der Wege zwischen den Punkten, ein Zeitwert von ca. 240 Minuten ergab. Bei der Überführung des Gerätes auf die Isolierstation war darauf zu achten, dieses zuvor gründlich zu reinigen und zu desinfizieren sowie selbst grüne OP - Kleidung anzulegen. Nach Abschluss jeder Messung wurden die entsprechenden Filterhalter samt Gelatine Planfilter in einen Einwegbeutel überführt und in die Transporttasche gegeben, um weitere Kontaminationen zu vermeiden.

3.2.1.3 Weiterverarbeitung der Luftproben

Die gesammelten Proben aus der Umgebungsluft wurden nach Abschluss der Gewinnung der Luft- und Patientenproben in Kultur gebracht. Dazu wurden die Gelatine-Planfilter vorsichtig mit einer Flachpinzette aus dem Filterhalter genommen und jeweils auf eine Malzextrakt-Agar-Platte plus Chloramphenicol übertragen. Dabei wurde darauf geachtet die Filter möglichst genau zu platzieren, da ein späteres Arrangieren, aufgrund ihrer Eigenschaft sich direkt mit dem Medium zu verbinden,

nicht mehr möglich war. Die Platten wurden im Anschluss an ihr Beimpfen in den Inkubator gegeben. Dieser enthielt 1L Aqua dest. um für eine ausreichende Befeuchtung zu sorgen und somit ein Austrocknen der Platten zu verhindern. Die Isolate wurden dann für 3 Tage bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Platten hinsichtlich des Wachstums von Schimmelpilzen kontrolliert. Mutmaßliche Aspergilli wurden zunächst registriert und dann abgeimpft. Dazu wurde eine sterile Impfnadel in das Myzel des Pilzes gestochen und kurz gedreht. Wichtig war es, die Platten, auf welchen die Pilze wuchsen, nicht ganz und auch nur kurz zu öffnen um die Verteilung der Sporen in der Umgebungsluft einzuschränken. Die Impfnadel wurde dann hintereinander an drei Stellen einer frischen Malzextrakt Agar Platte plus Chloramphenicol eingestochen. Dabei wurde der Nährboden nur angestochen, nicht durchstochen, da dies zu einer Zerstörung des Nährmediums geführt hätte. Auch hier war es wieder wichtig, dass die Platte so wenig wie möglich geöffnet wurde, um eine Kontamination der Platte mit möglicherweise umherfliegenden Sporen aus der Umgebungsluft zu verhindern. Die Reinkulturen wurden für 5 bis 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.2 Meteorologische Parameter

Für das Auftreten von Pilzen spielen unter Anderem meteorologische Parameter eine besondere Rolle. Wir sammelten Daten über Temperatur, Luftfeuchte, Taupunkt, Windgeschwindigkeit und den Luftdruck während der 12 Monate. Diese Daten wurden über das Internet von der Wetterstation Köln Neu-Ehrenfeld [109] bezogen. Aus den am Tag der Messungen erhobenen meteorologischen Parametern wurde jeweils ein Mittelwert für den entsprechenden Monat gebildet.

Die Jahreszeiten unterteilen das Jahr in verschiedene Perioden, welche sich durch charakteristische astronomische oder klimatische Eigenschaften auszeichnen. Im alltäglichen Sprachgebrauch sind damit hauptsächlich meteorologisch deutlich voneinander unterscheidbare Jahresabschnitte gemeint; in gemäßigten Breiten sind dies Frühling, Sommer, Herbst und Winter, in den Tropen sind es Trockenzeit und Regenzeit [110].

Die Zuordnung der Monate zu den jeweiligen Jahreszeiten erfolgte nach meteorologischen Gesichtspunkten. Zum Winter gehören die Monate Dezember, Januar und Februar. Der Frühling besteht aus den Monaten März, April und Mai, der

Sommer aus den Monaten Juni, Juli und August. Zum Herbst zählen die Monate September, Oktober und November.

3.2.2.1 Temperatur

Die Temperatur ist eine physikalische Größe, die vor allem in der Thermodynamik eine wichtige Rolle spielt. Ihre SI-Einheit ist das Kelvin (K). In Deutschland, Österreich und der Schweiz ist die Einheit Celsius (°C) ebenfalls zulässig [111].

3.2.2.2 Relative Luftfeuchtigkeit

Die Luftfeuchtigkeit, oder kurz Luftfeuchte, bezeichnet den Anteil des Wasserdampfs am Gasgemisch der Erdatmosphäre oder in Räumen. Das geläufigste Maß für die Luftfeuchte ist die relative Luftfeuchte, angegeben in %. Unter der relativen Luftfeuchte versteht man das Verhältnis der tatsächlich enthaltenen zur maximal möglichen Masse (Menge) des Wasserdampfes in der Luft [112].

Die relative Feuchte lässt unmittelbar erkennen, in welchem Grade die Luft mit Wasserdampf gesättigt ist [112]:

Bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% enthält die Luft nur die Hälfte der Wasserdampfmenge, die bei der entsprechenden Temperatur maximal enthalten sein könnte [112].

Bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit ist die Luft vollständig mit Wasserdampf gesättigt. Wird die Sättigung von 100% überschritten, so schlägt sich die überschüssige Feuchtigkeit als Kondenswasser bzw. Nebel nieder [112].

3.2.2.3 Taupunkt

Als Taupunkt oder Taupunktstemperatur bezeichnet man die Temperatur, bei der sich auf einem Gegenstand bei vorhandener Feuchte ein Gleichgewichtszustand von kondensierendem und verdunstendem Wasser einstellt, das heißt, dass die Kondensatbildung gerade einsetzt [113].

Luft, die nicht vollständig mit Wasserdampf gesättigt ist, hat eine relative Feuchte kleiner als 100% und kann – bei unveränderter Temperatur – weiteren Wasserdampf aufnehmen. Nimmt die Temperatur ab, nimmt auch die Aufnahmefähigkeit der Luft für Wasserdampf ab, das heißt, die relative Feuchte steigt an. Beim Taupunkt ist eine relative Feuchte von 100% erreicht, es kommt zur Kondensation. Dabei bildet sich auf festen oder flüssigen Grenzflächen ein Flüssigkeitsfilm [113].

In der Meteorologie gibt der Taupunkt die Grenztemperatur an, bei der, in Abhängigkeit vom Luftdruck, der in der Luft enthaltene Wasserdampf gerade damit beginnt Kondensat (Tropfen, Eiskristalle) zu bilden.

3.2.2.4 Windgeschwindigkeit

Die Windgeschwindigkeit ist der Weg, den Luft pro Zeiteinheit im Raum zurücklegt. Die Windgeschwindigkeit wird unter Anderem in Kilometer pro Stunde (km/h) ausgedrückt.

3.2.2.5 Luftdruck

Der Luftdruck ist der hydrostatische Druck der Luft, der an einem beliebigen Ort der Erdatmosphäre herrscht und gemessen werden kann. Die SI-Einheit des Luftdrucks ist das *Pascal* oder die Einheit *Bar* ($\text{bar} = 10^5 \text{ Pa}$) [114].

3.2.3 Patienten

3.2.3.1 Einschlusskriterien

Es wurden alle Patienten eingeschlossen, welche sich im Zeitraum von Dezember 2007 bis einschließlich November 2008 im Rahmen eines stationären Aufenthaltes auf Station 13 A oder B befanden. Die Patienten mussten mindestens 18 Jahre alt sein und nach Aufklärung ihr Einverständnis für die Probensammlung geben.

3.2.3.2 Ausschlusskriterien

Nicht eingeschlossen wurden Patienten, welche das 18. Lebensjahr noch nicht erreicht hatten sowie Patienten, welche ihr Einverständnis verweigerten oder aber am entsprechenden Untersuchungstag nicht auf Ihrem Zimmer anzutreffen waren.

3.2.3.3 Patientendaten

Die Daten wurden in pseudonymisierter Form, d.h. ohne direkten Bezug zum Namen des Patienten aufgezeichnet. Den Patienten wurde jeweils eine Nummer zugewiesen. Die Nummerierung erfolgte aufsteigend und beginnend mit der Zahl 1.

3.2.3.4 Entnahme der Patientenproben

Bei allen nach Einschlusskriterien geeigneten Patienten, welche sich im Studienzeitraum stationär auf den Stationen 13a und b befanden, wurde jeweils einmal pro Woche ein Nasenabstrich genommen. Die Nasenabstriche wurden am selben Tag, an welchem die Sammlung der Luftproben stattfand, gewonnen. Die Durchführung gestaltete sich wie folgt: Ein steriler Tupfer wurde etwa 2 cm in eines der Nasenlöcher des Patienten eingeführt und an der Mukosa gedreht. Anschließend wurde mit demselben Tupfer ein Abstrich von der Mukosa des zweiten Nasenlochs genommen und schließlich in das Transportmedium überführt. Während des gesamten Vorgangs wurden seitens der Durchführenden Handschuhe getragen. Die gewonnenen Proben wurden unmittelbar nach Abschluss der Probengewinnung weiterverarbeitet, um eine Überwucherung der möglicherweise isolierten Pilze mit Bakterien zu vermeiden.

3.2.3.5 Weiterverarbeitung der Patientenproben

Unter der Werkbank wurde der Tupfer auf einer Malzextrakt-Agar-Platte, welche zusätzlich Chloramphenicol enthielt, doppelt ausgestrichen. Direkt im Anschluss wurde derselbe Tupfer in einem Röhrchen, welches Sabouraud-Flüssigmedium enthielt ausgeschüttelt. Im Anschluss wurden die Platten und Flüssigmedien für 3 bis 4 Tage bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Nach diesen 3 bis 4 Tagen der Inkubation, erfolgte eine Kontrolle hinsichtlich des Wachstums von Schimmelpilzen. Darunter vermutete Aspergilli wurden wie bereits unter Punkt 3.2.1.3 beschrieben abgeimpft und in Reinkultur angezüchtet. Die Reinkulturen wurden für 5 bis 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.4 Identifikation und Konservierung der Pilze

3.2.4.1 Makroskopische Beurteilung der Reinkulturen

Nach abgeschlossener Bebrütung der Reinkulturen wurden diese makroskopisch beurteilt. Hier waren Wachstum sowie Wachstumsgeschwindigkeit und Farbe bereits erste Hinweise darauf, ob es sich bei dem Pilz tatsächlich um einen Pilz der Gattung *Aspergillus* spp. handelte. Auch konnten schon erste Schlüsse auf die *Aspergillus*-Art gezogen werden.

3.2.4.2 Mikroskopische Beurteilung der Reinkulturen

Die mikroskopische Identifikation der Pilze erfolgte, wenn sich die Kultur im Anfangsstadium ihres Wachstums befand und gerade begann Konidien und Sporen auszubilden und im Zweifelsfall noch einmal wenige Tage später. Ältere Kulturen eigneten sich nicht mehr für die mikroskopische Beurteilung, weil in vielen Fällen das Problem bestand, dass Konidien und Sporen, welche für die Bestimmung der Art wichtig sind, aufgrund der zunehmenden Konidienbildung, nicht mehr ausreichend zu beurteilen waren.

Die morphologische Identifikation der Aspergilli erfolgte nach Standardmethoden mithilfe des Lichtmikroskops. Es gibt verschiedene Methoden für die Herstellung eines Präparates zur mikroskopischen Untersuchung der Pilzkulturen. Zwei, der Verwendeten seien im Folgenden genannt.

Zupfpräparat. Um ein Zupfpräparat herzustellen wurde eine sterile Impfnadel genutzt um ein Stück des Pilzes zu entnehmen. Während dieses Stück noch an der Impfnadel hing wurde bereits ein kleiner Tropfen 70%iger Alkohol darauf gegeben um einen Großteil der Konidien abzuspülen. Pilzstück und Alkoholtropfen wurden dann auf einen Objektträger, auf welchem bereits ein Tropfen Lactophenolblau gegeben wurde, übertragen. Lactophenolblau diente dazu den Pilz zu färben. Mit Hilfe einer zweiten sterilen Impfnadel wurde dann versucht, das Pilzstück vorsichtig auseinander zu zupfen. Abschließend wurde ein Deckgläschen fest darauf gedrückt. Diese Methode bewahrte nicht immer die ursprüngliche Position und Struktur der Konidien, Sporen und anderen Pilzelemente. Sie war jedoch sehr schnell durchzuführen und alle Kulturen wurden zunächst mithilfe dieser Methode beurteilt.

Tesafilm®-Präparat. Eine andere schnelle Methode ein Präparat für die mikroskopische Beurteilung herzustellen ist das *Tesafilm®*-Präparat. Dazu wurde ein ca. 4cm langer Streifen *Tesafilm®* verwendet. Dieser wurde zu einer Schlaufe geschlagen, sodass sich die klebrige Seite an der Außenseite befand, die beiden Enden wurden mithilfe einer Pinzette zusammengehalten. Der, der Pinzette gegenüberliegende, klebrige Teil des *Tesafilm®*, wurde kräftig auf die Oberfläche der Pilzkultur gedrückt und sanft abgelöst; das Luftmyzel, Konidien und Sporen blieben daran kleben. Anschließend wurde der *Tesa®*-Streifen geöffnet und auf einen Objektträger geklebt. Auf den Objektträger wurden zuvor noch ein Tropfen Lactophenolblau und ein Tropfen 70%iger Alkohol gegeben. Diese Methode eignete sich besonders um die ursprüngliche Position der Pilzstrukturen zu erhalten.

Die anschließende Betrachtung und Identifizierung der Pilze unter dem Lichtmikroskop erfolgte nach Standardmethoden mithilfe des *Atlas of Clinical Fungi* von *de Hoog et al.*

3.2.4.3 Konservierung von *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* und *A. terreus*

Ausgewählte Stämme von *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* und *A. terreus* wurden konserviert. Welcher Pilz dazu ausgewählt wurde, blieb der Untersuchenden überlassen. Makroskopische Farbgebung und mikroskopische Besonderheiten waren beispielsweise Entscheidungshilfen. Je Pilz wurden 4 sterile Mikro-Schraubröhren (2ml) und 1 steriles Zentrifugen-Röhrchen (15ml) benötigt. Die Mikro-Schraubröhren wurden mit ca. 1,5ml autoklavierter Magermilch und das Zentrifugen-Röhrchen mit ca. 10ml autoklavierten, 5%igen Glycerin gefüllt. Die Sporen des zu konservierenden Pilzes wurden mit einem größeren Tropfen Aqua dest. unter Zuhilfenahme einer Pipette mit einer 1000µl Pipettenspitze „eingesammelt“. Die Sporen wurden anschließend in die insgesamt 5 vorbereiteten Röhrchen übertragen. Das Zentrifugen-Röhrchen wurde bei Raumtemperatur gelagert, 2 der Mikro-Schraubröhren wurden bei -20°C und die übrigen beiden bei -80°C tiefgefroren.

Da die Pilze bei Raumtemperatur und auch bei -20°C langsam weiterwuchsen, zeigten sich diese Methoden der Konservierung für die Langzeitaufbewahrung als nicht sinnvoll. Zum 20.08.2008 wurden die Stämme nur noch bei -80°C in je einer Mikro-Schraubröhre, welche mit ca. 1,5ml autoklavierter Magermilch gefüllt wurde,

eingefroren. Die Sporen wurden weiterhin mit einem größeren Tropfen Aqua dest. unter Zuhilfenahme einer Pipette mit einer 1000µl Pipettenspitze „eingesammelt“.

Aufgrund wiederholter Kontamination der Magermilch wurde zum 20.08.2008 das MikroBank® System der Firma *Inverness medical* eingeführt. Von den ausgewählten Stämmen wurden Sporen mithilfe einer sterilen Impföse abgetragen und direkt in ein entsprechendes Mikro-Röhrchen des MikroBank® Systems überführt. Nach kurzer Standzeit wurde das im Röhrchen ab Werk enthaltene Flüssignährmedium abpipettiert und die Probe schließlich bei -80°C tiefgefroren. Da das System fertig gestellt zu erwerben war, wurde das Risiko einer Kontamination vermindert und der Vorgang der Konservierung einfacher zu wiederholen und standardisierbar. Das Mikrobank® System bietet desweiteren den Vorteil, dass von einer eingefrorenen Probe zukünftig bis zu 15 neue Reinkulturen angezüchtet werden können.

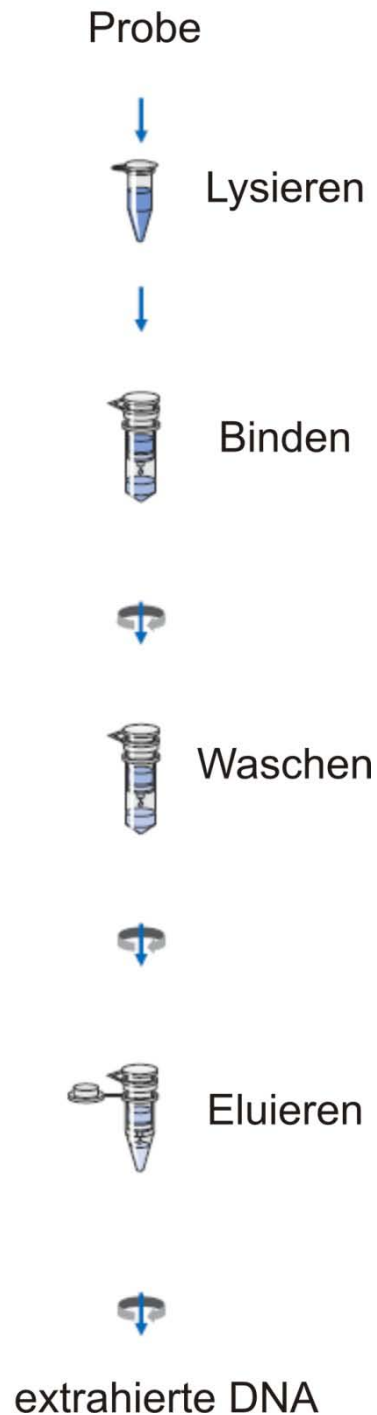
3.2.5 Molekulare Genotypisierung der *A. terreus* Stämme

3.2.5.1 DNA-Extraktion mit DNeasy Blood and Tissue Kit (250) von Qiagen

Es wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit (250) der Firma Qiagen verwendet um DNA für die RAPD-PCR zu extrahieren. Als Grundlage für die Versuchsdurchführung diente das entsprechende Protokoll der Firma Qiagen. Eine schematische Darstellung findet sich in **Abbildung 11**. Zu Beginn wurden zwei Wasserbäder auf 37°C und 55°C erhitzt. Die Lytikase wurde aus dem Gefrierschrank entnommen und schließlich bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Reagiergefäße (2ml) wurden entsprechend der 9 *Aspergillus terreus*-Stämme beschriftet. Im Anschluss daran wurden mithilfe eines Glasspatels Proben von den 9 isolierten *A. terreus*-Stämmen von den Kulturen abgetragen und in die jeweiligen Reagiergefäße (2ml) übertragen. Die aufgetaute Lytikase wurde noch einmal für 5 bis 10 Sekunden gevortext, sodass dann jeweils 500µl Lytikase zu den entnommenen *Aspergillus*-Proben gegeben werden konnten. Die Gemische wurden nochmals für 5 bis 10 Sekunden gevortext und für 45 Minuten bei 37°C ins Wasserbad gestellt. Währenddessen wurde das *DNeasy Blood and Tissue Kit (250)* von *Qiagen* vorbereitet und die darin enthaltenen Collection-Tubes, welche mit den DNeasy Mini Spin Columns versehen sein sollten, wurden entsprechend der Pilzstämme mit Zahlen von 1 bis 9 beschriftet. Die Gemische von Lytikase und *A. terreus* wurden nach 45 Minuten Inkubationszeit aus

dem Wasserbad herausgenommen und anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 4100U/min zentrifugiert und die Überstände abpipetiert. Zu den Pellets wurden nun jeweils 180µl ATL Puffer und 20µl Proteinkinase K dazugegeben, alle 9 Proben gevortext und zunächst für 20 Minuten ins 55°C warme Wasserbad gestellt. Nach 20 Minuten wurden die 9 Proben nochmals aus dem Wasserbad genommen und für ca. 5 bis 10 Sekunden gevortext, danach wurden jeweils 200µl AL Puffer dazugegeben und die Proben noch einmal kurz gevortext. Zwischenzeitlich sollte das zuvor 55°C warme Wasserbad auf 70°C aufgeheizt werden, sodass die Proben für 10 Minuten in das 70°C warme Wasserbad gestellt werden konnten. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurden alle 9 Proben dem Wasserbad entnommen und dieses schließlich abgeschaltet. Zu jeder der 9 Proben wurden nun noch jeweils 200µl Ethanol (99%) beigegeben und jedes Reagiergefäß noch einmal gevortext. Anschließend wurde der gesamte Inhalt der Reagiergefäße mithilfe einer 1000µl Pipette entnommen und auf die DNeasy Mini Spin Columns, welche sich in den Collection-Tubes befinden sollten, aufgetragen. Die Säulen wurden anschließend für 1 Minute bei 9000U/min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Säulen aus den Collection-Tubes genommen und auf neue Collection-Tubes aufgesetzt. Die alten Collection-Tubes konnten entsorgt werden. Die Puffer AW 1 und 2 wurden nach den auf der Flasche befindlichen Angaben, mit Ethanol (99%) verdünnt. Jeweils 500µl AW 1 Puffer wurden dann auf die Säulen gegeben und die Tubes dann wieder bei 9000U/min für 1 Minute zentrifugiert. Nach diesem Arbeitsschritt wurden wiederum die „alten“ Collection-Tubes samt Zentrifugat verworfen und die Säulen erneut auf „frische“ Collection-Tubes aufgesetzt. Dann wurden jeweils 500µl AW 2 Puffer auf die Säulen gegeben und die Tubes noch einmal bei 9000U/min für 1 Minute zentrifugiert. Auch nach diesem Schritt wurden die Collection-Tubes samt Zentrifugat verworfen und die Säulen auf sterile 2ml Reagiergefäße aufgesetzt. Abschließend wurden 50µl AE Puffer auf die Säulen gegeben und die 9 Tubes für 1 Minute bei 13000U/min zentrifugiert. Danach wurden die Säulen verworfen und übrig blieben je Probe 100µl Extraktionsprodukt. Die DNA-Proben wurden bei -20°C tiefgefroren.

Abbildung 11: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit der Fa. Qiagen. Modifiziert nach DNeasy Blood & Tissue Handbook 07/2006 [88].



3.2.5.2 DNA-Extraktion mit Ultra Clean von Mo Bio Laboratories [15]

Mithilfe des Ultra Clean Kits von Mo Bio Laboratories wurde DNA aus den 9 *A. terreus* Stämmen für die Rep-PCR gewonnen. Ein entscheidender Unterschied zur DNA-Extraktion mithilfe des DNeasy Blood and Tissue Kits der Firma Qiagen ist, dass die Zellwand der Pilze neben dem Einsatz von Lytikasen, auch mechanisch aufgebrochen wird. Die DNA-Extraktion wurde nach beigefügtem Protokoll durchgeführt. Während der Durchführung wurden Handschuhe getragen.

Vor der Durchführung wurden die benötigten Materialien vorbereitet und entpackt sowie die MicroBead-Tubes den 9 *A. terreus*-Stämmen entsprechend beschriftet. Mit einem Glasspatel wurde jeweils eine Probe Pilzkultur in das entsprechende 2ml Collection-Tube, welches ein ab Werk beigefügtes Nährmedium enthält, überführt. Im Anschluss daran wurden die 9 Proben bei Raumtemperatur und 10000xg für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand zunächst abgegossen. Die Collection-Tubes wurden nochmals bei Raumtemperatur und 10000xg für 30 Sekunden zentrifugiert, danach der verbleibende Überstand abpipettiert. Dieser Schritt diente dazu das zuvor eingebrachte Pilzmaterial zu konzentrieren und ein Pellet daraus zu bilden. Die Pellets wurden dann in 300µl MicroBead-Solution resuspendiert und kurz gevortext um alles gut zu vermischen und schließlich in die entsprechenden MicroBead-Tubes pipettiert. Die MicroBead-Solution enthält Salze und Puffer, welche die Zellen vor der Lyse stabilisieren. Es wurden je 50µl Solution MD 1 zu den MicroBead-Tubes gegeben. Solution MD 1 enthält Natriumlaurylsulfat und andere spaltende Reagenzien für die Zelllyse. Zusätzlich ist Natriumlaurylsulfat ein anionisches Detergenz, welches Fettsäuren und Lipide der Zellmembranen degradiert. Die MicroBead-Tubes wurden nun entsprechend den Halterungen des Mo Bio Vortex Adapters in horizontaler Lage in den Adapter eingesteckt und bei maximaler Geschwindigkeit für 45 Minuten gevortext. Hier wurde vom ursprünglichen Protokoll abgewichen, da Pilze eine sehr stabile Zellwand aufweisen, sodass eine längere Lysezeit für ein gutes Ergebnis nötig war. Nach dem Vortexen wurden die Tubes bei Raumtemperatur und 10000xg für 30 Sekunden zentrifugiert. Dabei lagerte sich der Zellschutt am Boden der Tubes ab, wobei die DNA im Überstand verblieb. Der Überstand wurde dann je in ein frisches 2ml Collection-Tube pipettiert. Die Überstände wiesen ein Volumen von 300 bis 350µl auf, abhängig davon wie viel Zellmaterial zu Beginn verwendet wurde. Anschließend wurden jeweils 100µl

Solution MD 2 dazu gegeben, das Gemisch für 5 Sekunden gevortext und für 5 Minuten bei 4°C in den Kühlschrank zum Inkubieren gestellt. Im Anschluss daran wurden die Tubes bei Raumtemperatur und 10.000xg für 1 Minute zentrifugiert. Solution MD 2 besteht aus einem Reagenz, welches organisches und nicht-organisches Material, Zellschutt und Proteine ausfällt. Es war wichtig dieses kontaminierende Material zu entfernen, um die Reinheit der DNA zu erhöhen. Der gesamte Überstand mit einem Volumen von ca. 450µl wurde dann in je ein neues 2ml Collection-Tube pipettiert, dazu wurden dann je 900µl von Solution MD 3 pipettiert und die Tubes für ca. 5 Sekunden gevortext. Bei Solution MD 3 handelt sich um eine hochkonzentrierte Salzlösung, welche das nötige Milieu für die Bindung der DNA an die Spin Filter Membran schuf. Jeweils 700µl der in den 9 Tubes enthaltenen Flüssigkeit wurden in ein entsprechendes Spin-Filter-Tube pipettiert, welche dann bei Raumtemperatur und 10.000xg für 30 Sekunden zentrifugiert wurden. Nach dem Zentrifugieren wurde die komplette zentrifugierte Flüssigkeit verworfen und der restliche Inhalt der 2ml Collection-Tubes auf die Spin-Filter pipettiert, welche dann wiederum bei Raumtemperatur und 10.000xg für 30 Sekunden zentrifugiert wurden. Das flüssige Zentrifugat wurde komplett verworfen. Für jede Probe mussten also 2 Ladungen der Spin-Filter-Tubes erfolgen. Die DNA wurde während dieses Schrittes selektiv an die Spin-Filter-Membran gebunden, alle übrigen Stoffe passierten die Membran. Schließlich wurden von Solution MD 4 jeweils 300µl dazugegeben und die Tubes bei Raumtemperatur und 10.000xg für 30 Sekunden zentrifugiert. Solution MD 4 ist eine Waschlösung auf der Basis von Ethanol, welche dazu verwendet wurde Reste von Salzen und anderen Fremdstoffen von der DNA zu waschen, während diese an der Filtermembran verbleibt. Das Zentrifugat wurde wieder verworfen und die Tubes noch einmal bei Raumtemperatur und 10.000xg für 1 Minute zentrifugiert, um Überreste der Solution MD 4 zu entfernen. Anschließend wurde der Spin-Filter aus den Tubes genommen, ohne Flüssigkeit darauf kommen zu lassen, und die Filter in neue 2ml Collection-Tubes gesteckt. Zuletzt wurden jeweils 50µl der Solution MD 5 auf die Mitte der Filter aufgetragen und die Tubes bei Raumtemperatur und 10.000xg für 30 Sekunden zentrifugiert. Solution MD 5 eluierte die DNA aus der Membran. Die DNA konnte nur an der Membran des Filters binden, wenn Salz vorhanden war. Bei Solution MD 5 handelt es sich um 10mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und sie enthält kein Salz. Nach dem Zentrifugieren konnten die Spin-

Filter verworfen und die DNA bei -20°C eingefroren werden. Siehe hierzu auch die folgende Tabelle.

Tabelle 4: Arbeitsschritte der DNA-Extraktion nach Ultra Clean Kit der Fa. Mo Bio Laboratories. Die beschriebenen Arbeitsschritte gelten jeweils für eine Probe. Insgesamt wurden 9 Proben parallel bearbeitet.

Arbeitsschritt	
1	Collection-Tube (2ml) + Pilzmaterial; zentrifugieren bei RT, 10.000xg, 30 Sek.; Überstand abgießen
2	Collection-Tube (2ml) + Pilzmaterial; zentrifugieren bei RT, 10.000xg, 30 Sek.; Überstand abpipettieren
3	Pellet in 300µl MicroBead-Solution resuspendieren; 5 Sek. vortexen; komplettes Volumen in MicroBead-Tube pipettieren
4	+50µl Solution MD 1, 45 Min mit Mo Bio Vortex Adapter und max. Geschwindigkeit vortexen,; zentrifugieren bei RT, 10.000xg, 30 Sek.; Überstand in neues 2ml Collection-Tube pipettieren
5	+100µl Solution MD 2; 5 Sek. vortexen; bei 4°C für 5 Min. inkubieren; zentrifugieren bei RT, 10.000xg, 1 Min; Überstand in neues 2ml Collection-Tube pipettieren
6	+900µl Solution MD 3; 5 Sek. vortexen
7	700µl von Gemisch aus Schritt 6 in Spin-Filter-Tube pipettieren; zentrifugieren bei RT, 10.000xg, 30 Sek., Zentrifugat verwerfen
8	Rest von Gemisch aus Schritt 6 in Spin-Filter-Tube pipettieren; zentrifugieren bei RT, 10.000xg, 30 Sek., Zentrifugat verwerfen
9	+300µl Solution MD 4 auf Spin-Filter pipettieren; zentrifugieren bei RT, 10.000xg, 30 Sek.; Zentrifugat verwerfen
10	Spin Filter Tubes bei RT, 10.000xg, 1 Min. zentrifugieren; Spin-Filter in neues 2ml Collection-Tube stecken
11	+50µl Solution MD 5 auf Mitte des Filters pipettieren; zentrifugieren bei RT, 10.000xg, 30 Sek.; Filter verwerfen
12	DNA bei -20°C einfrieren

3.2.5.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis

Die „zufällige“ Amplifikation von DNS (RAPD), auch als „arbitrarily primed PCR“ (AP-PCR) bezeichnet, kann als Typisierungsverfahren für epidemiologische Fragestellungen verwandt werden [60, 67]. Diese Methode basiert auf dem Einsatz eines kurzen Primers, dessen Sequenz nicht spezifisch gegen ein bekanntes Target-Gen gerichtet ist und der somit „zufällig“ an verschiedene Bereiche im Genom hybridisieren kann. Wenn zwei dieser Bereiche nahe genug benachbart liegen, kann die dazwischen liegende Sequenz amplifiziert und in der Gelelektrophorese visualisiert werden [5]. Die erzeugten Bandenmuster oder DNS-Fingerprints unterscheiden sich entsprechend dem Grad der Verwandtschaft der untersuchten Stämme.

Für die RAPD-Analyse der zuvor mithilfe des „DNeasy Blood and Tissue Kit“ isolierten DNA wurden die „Ready-To-Go RAPD Analysis Beads“ der Firma *GE Healthcare* verwendet. Bei diesen „Beads“ handelt es sich um Raumtemperatur stabile Kügelchen, welche Puffer [3mM MgCl₂, 30mM KCl und 10mM Tris, (pH 8,3)], dATP (0,4mM), dCTP (0,4mM), dGTP (0,4mM), dTTP (0,4mM), bovines Serumalbumin (BSA) (2,5µg) sowie AmpliTaqTM DNA-Polymerase enthalten. Zu Beginn wurden die entsprechenden Vorbereitungen getroffen sowie alle nötigen Materialien unter die Sterilbank gestellt, unter welcher das Pipettieren der Polymerasekettenreaktion (PCR) stattfand. Die PCR für die Primer C II (5'-GCGCACGG-3') und R 108 (5'-GTATTGCCCT-3') konnten parallel pipettiert werden, da beide PCRs das gleiche Thermocycler-Programm durchlaufen konnten. Die PCR mit Primer P 4 (5'-GATAGATAGATA-3') wurde am darauffolgenden Tag durchgeführt, die Durchführung unterschied sich nicht von den beiden anderen PCRs. Zuerst wurden Handschuhe angezogen und anschließend die benötigten Primer C II (5'-GCGCACGG-3') und R 108 (5'-GTATTGCCCT-3') oder P 4 (5'-GATAGATAGATA-3') und die DNA-Proben der 9 *A. terreus*-Stämme aus dem -20°C Gefrierfach genommen und aufgetaut. Eine Eisbox mit einer entsprechenden Halterung für die PCR-Tubes wurde vorbereitet und neun PCR-Tubes pro PCR-Ansatz wurden entsprechend der Proben mit Zahlen von 1 bis 9 aufsteigend sowie den Kürzeln C und R oder P, welche den Primern entsprachen, gekennzeichnet. Für jeden PCR-Ansatz wurden neun der „Ready-To-Go RAPD Analysis Beads“, welche einzeln und steril verpackt im Kit vorliegen, wurden dem Kit entnommen und auch

unter die Sterilbank gebracht. Hierauf folgend wurden die Kügelchen auf die PCR-Tubes verteilt. Dabei war zu beachten, dass die Kügelchen in den meisten Fällen elektrostatisch aufgeladen waren, sodass es vor dem Öffnen ihres Behältnisses nötig war, den Boden einmal kurz auf die Arbeitsfläche aufzuschlagen, so konnten die Kügelchen meist einfach in die PCR-Tubes gegeben und die Tubes anschließend in die Eisbox gestellt werden. Nach diesem Schritt musste die nötige Mastermixmenge berechnet werden. Der Mastermix bestand aus Wasser – RNasefrei für PCR (Charles River Endosafe, Sulzfeld, Deutschland) und je einem der 3 oben genannten Primer. Auf jedes PCR-Tube sollten 17,5µl PCR-Wasser und 2,5µl eines Primers pipettiert werden. Da 9 Pilzproben vorlagen, wurden die genannten Mengen pro Tube der Einfachheit halber mit 10 multipliziert. Es ergaben sich somit die folgenden 3 Mastermixe:

- Mastermix C II: 175 µl PCR-Wasser + 25µl Primer C II
- Mastermix P 4: 175µl PCR-Wasser + 25µl Primer P 4
- Mastermix R 108: 175µl PCR-Wasser + 25µl Primer R 108

Die Reagenzien wurden in je ein 1ml Reagiergefäß pipettiert und abschließend gevortext. Diesem Schritt folgte dann das Pipettieren von je 20µl Mastermix auf die „Ready-To-Go RAPD Analysis Beads“ in den PCR-Tubes. Das Pipettieren erfolgte auf Eis um eine vorzeitige Reaktion der in den „Beads“ enthaltenen AmpliTaq™ DNA-Polymerasen zu vermeiden. Die DNA-Proben wurden nach dem Auftauen noch einmal für ca. 3 Sekunden gevortext, anschließend wurden von jeder Probe jeweils 5µl DNA in das der Probennummer entsprechende PCR-Tube pipettiert. Dabei galt es die Pipettenspitze tief genug in das Tube einzuführen und die Pipette mehrmals zügig wieder aufzuziehen und zu entleeren um für eine ausreichende Durchmischung zu sorgen. Dieser Schritt erfolgte je Probe 3 Mal, da aufgrund der 3 Primer, 3 Versuchsansätze vorlagen. Nach Abschluss des Pipettierens wurden die PCR-Tubes mit entsprechenden PCR-Tube-Strips fest verschlossen. Abschließend wurde mit einem sorgfältigen Blick kontrolliert ob die PCR-Ansätze in allen PCR-Tubes frei von Luftblasen waren und sich die gesamte Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befand. War dem nicht so, wurden die PCR-Tubes kurz in der Mikrozentrifuge für 5 Sekunden zentrifugiert. Zuletzt wurden die Proben in der Eisbox zum Thermocycler Thermoblock Uno II (Biometra biomedizinische Analytik GmbH,

Göttingen, Deutschland) transportiert. Für die Proben, welche den Primer C II und R 108 enthielten wurde das Programm Nr. 14 gestartet.

Das Programm Nr. 14 dauerte insgesamt 3h 25min und setzte sich aus den folgenden Programmschritten zusammen:

Tabelle 5: Programm Nr. 14

Die hellgrau unterlegten Teilschritte wurden 35 Zyklen in Folge wiederholt.

Die dunkelgrau unterlegten Teilschritte wurden 5 Zyklen in Folge wiederholt.

Schritt	Temp. (°C)	Dauer (Min.)
Denaturierung	94	5
Hybridisierung	30	1
Prolongation	72	1
Denaturierung	94	1
Hybridisierung	36	1
Prolongation	72	1
Denaturierung	94	1
Hybridisierung	36	1
Prolongation	72	5
Ende und Kühlung	4	

Die Proben, welche Primer P 4 enthielten durchliefen Programm Nr. 16 des Thermocyclers Thermoblock Uno II (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland). Die Dauer von Programm Nr. 16 betrug insgesamt 5h 12min und setzte sich aus den folgenden Programmschritten zusammen:

Tabelle 6: Programm Nr. 16

Die hellgrau unterlegten Teilschritte wurden 45 Zyklen in Folge wiederholt.

Schritt	Temp. (°C)	Dauer (Min.)
Denaturierung	94	5
Hybridisierung	35	2
Prolongation	72	2
Denaturierung	94	1
Hybridisierung	35	2
Prolongation	72	2
Prolongation	72	10
Ende und Kühlung	4	

Nach Beendigung der Thermocycler-Programme wurden die Proben zunächst bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.2.5.4 Agarosegelelektrophorese

Für die Produkte der RAPD-PCR wurden insgesamt 3 Agarosegele hergestellt, je eines für die Proben, welche mit Primer P 4, R 108 oder C II amplifiziert wurden. Für ein Agarosegel (1,5%) wurden 0,75g Agarosegranulat und 50ml 0,5M TBE Puffer gemischt und für ca. 2 Minuten unter zwischenzeitlichen Schwenken in der Mikrowelle erhitzt. Es musste eine Klumpen freie, klare Flüssigkeit entstehen. Das Gemisch wurde nach dem Erhitzen auf ca. 50°C herunter gekühlt und 2µl Ethidiumbromid dazugegeben und das Gefäß nochmals solange geschwenkt bis die rote Farbe des Ethidiumbromids nicht mehr zu sehen war. Anschließend wurde das Gel in die vorbereitete Form gegeben, welche zuvor auf einer geraden Unterlage ausgerichtet worden war. Luftblasen wurden mithilfe einer sterilen Pipettenspitze an den Rand des Gels gedrängt, sodass unmittelbar darauf der Kamm in das Gel eingeführt werden konnte. Das Gel wurde dann ca. für 30 Minuten stehen gelassen um auszukühlen und fest zu werden.

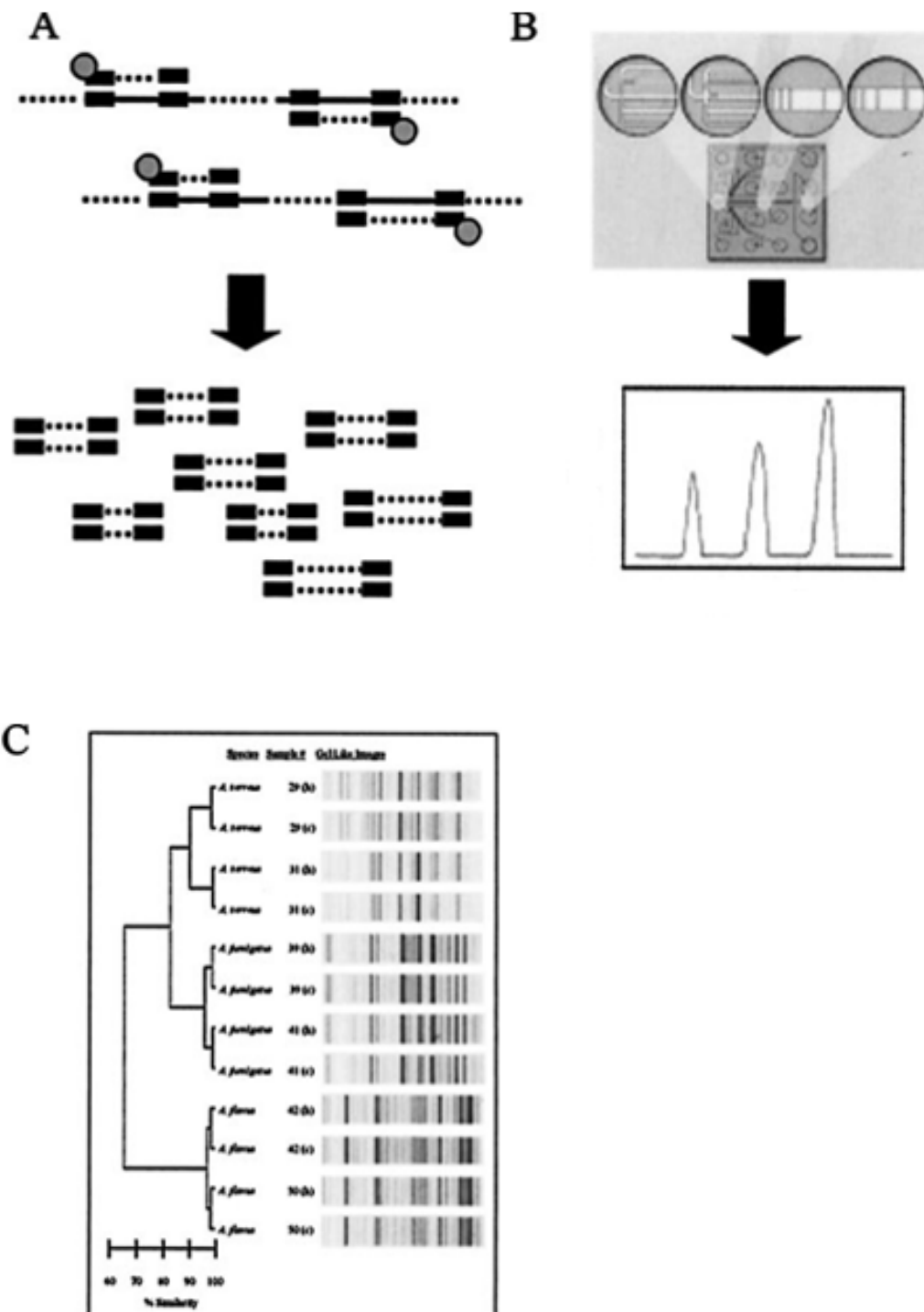
Für die Gelelektrophorese wurde die Wanne mit TBE-Puffer gefüllt und das Agarosegel eingelegt. In einer sterilen Lochplatte wurden je 8µl DNA mit Sample-Puffer gemischt und in die Geltaschen eingefüllt. Dabei wurden die äußeren Geltaschen freigelassen. Links und rechts von den bereits mit DNA bestückten Taschen wurde der Marker eingebracht (10µl). Anschließend wurde die Wanne mit ihrem Deckel verschlossen und das Gel an den Stromkreis angeschlossen. Bei 120V und 400mA lief es für 1,5 Stunden.

Die Gele wurden abschließend unter UV-Licht fotografiert und mithilfe von BioNumerics der Firma Applied Maths, Belgien, ausgewertet.

3.2.5.5 Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR)

Repetitive chromosomale Elemente, die zufällig verteilt im Pilzchromosom vorliegen, sind Zielstruktur dieser PCR basierten Methode. Wenn zwei dieser Elemente nahe genug beieinander liegen, kann der dazwischen liegende DNS-Bereich amplifiziert werden. Da die Anzahl und Lokalisation der repetitiven Elemente von Stamm zu Stamm variabel ist, können die mit der Rep-PCR ermittelten verschieden großen und verschieden zahlreichen Banden zur Differenzierung herangezogen werden [47].

Abbildung 12: Schematische Darstellung der rep-PCR und des DiversiLab Systems nach Healy *et al.* (A) Die rep-PCR-Primer binden an spezifische repetitive Sequenzen des Genoms und amplifizieren diverse Fragmente unterschiedlicher Länge. (B) Der Chip trennt die amplifizierten DNA-Fragmente nach ihrer Größe auf. Die Intensität der Fluoreszenz und die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente werden genutzt um von jeder DNA-Probe ein Elektropherogramm zu erstellen. (C) Beispiel für einen DiversiLab Report. Dieser zeigt die Daten der Analyse der DNA-Proben, ein Dendrogramm sowie Bilder, welche einer Aufteilung per Gelelektrophorese ähneln [47].



Das Diversilab System® der Firma Biomerieux, (Nürtingen, Deutschland) wurde herangezogen um den Mastermix für die 9 DNA-Proben, welche mittels des Ultra Clean Kits der Firma MoBio Laboratories gewonnen wurden zu berechnen. Folgende Zusammenstellung des Mastermixes ergab sich:

Tabelle 7: Zusammensetzung Mastermix rep-PCR.

µl/Probe		Total µl
18,0	Rep-PCR MM1	180,0
2,5	GeneAmp 10X PCR Puffer	25,0
2,0	Primer Mix	20,0
0,5	AmpliTaq DNA Polymerase	5,0
23,0/Probe	Total =	230,0

Alle benötigten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sowie eine Eisbox wurden vor Beginn unter die Werkbank gestellt. Die Mastermix Bestandteile sowie die DNA-Proben wurden aufgetaut. 9 PCR-Tubes wurden entsprechend der Probenanzahl mit Zahlen von 1 bis 9 nummeriert und in die Eisbox gestellt. Es wurden je 23µl Mastermix in die PCR-Tubes pipettiert. Die DNA-Proben wurden nach dem Auftauen noch einmal für ca. 3 Sekunden gevortext, anschließend wurden von jeder Probe jeweils 2µl DNA in das der Probennummer entsprechende PCR-Tube pipettiert. Dabei galt es die Pipettenspitze tief genug in das Tube einzuführen und die Pipette mehrmals zügig wieder aufzuziehen und zu entleeren um für eine ausreichende Durchmischung zu sorgen. Nach Abschluss des Pipettierens wurden die PCR-Tubes mit entsprechenden PCR-Tube-Strips fest verschlossen. Abschließend wurde mit einem sorgfältigen Blick kontrolliert ob die PCR-Ansätze in allen PCR-Tubes frei von Luftblasen waren und sich die gesamte Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befand. War dem nicht so, wurden die PCR-Tubes kurz in der Mikrozentrifuge für 5 Sekunden zentrifugiert. Zuletzt wurden die Proben in der Eisbox zum Thermocycler Thermoblock Uno II (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) transportiert. Der Thermocycler wurde vorgeheizt. Anschließend wurden die Proben in das Gerät eingebracht und das Programm repPCR50 gestartet.

Das Programm repPCR50 gliedert sich in folgende Teilschritte:

Tabelle 8: Programm repPCR50.

Schritt	Temp. (°C)	Dauer (Sek.)
Initiale Denaturierung	94	120
Denaturierung	94	30
Hybridisierung	50	30
Prolongation	70	90
Finale Prolongation	70	180
Ende und Kühlung	4	

3.2.5.6 Auswertung der rep-PCR mittels DiversiLab System®

Das DiversiLab System® für DNA-Analyse ist ein hilfreiches Werkzeug für die Erfassung der Bandbreite und Ursachen mikrobieller Infektionen, Kontaminationen oder aber auch für die Erstellung „genetischer Fingerabdrücke“, z. B. von Pilzen. Für ausgesuchte Erreger stehen Kits zu Verfügung, so auch für *Aspergillus* spp. Die Ausgangs-DNA für die Analyse, wird mithilfe der zuvor beschriebenen rep-PCR gewonnen. Von mikrobiologischen Isolaten können so, schnell und exakt Subspecies sowie Stamm bestimmt werden. Das Analyseprinzip sieht wie folgt aus: Der Agilent® 2100 Bioanalyzer bedient sich der Mikrochiptechnologie. Die DNA-Proben werden auf den Chip geladen und die DNA-Fragmente werden in den Mikrokapillaren des Chips entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Passieren die DNA-Fragmente während der Analyse den Laser, wird ein Signal generiert, welches in Form eines Elektropherogramms dargestellt wird. Ergebnis ist also ein „genetischer Fingerabdruck“ der untersuchten Proben. So schafft es das System die klassischen Schritte der Gelelektrophorese in nur einem automatisierten Prozess zu integrieren. Die „Fingerabdrücke“ verschiedener Proben können anschließend mit der DiversiLab Software verglichen werden.

Teil 1 der Durchführung beinhaltete zunächst die Separation der DNA-Fragmente. Dazu musste der Gel-Dye-Mix hergestellt werden. Die DiversiLab-DNA-Chip-Reagenzien wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt, in der Zwischenzeit wurde der Bioanalyzer eingeschaltet. DNA-Gel-Matrix sowie DNA-Dye-Konzentrat wurden kurz gevortext. In ein steriles Microtube wurden 200µl der DNA-Gel-Matrix und 10µl DNA-Dye-Konzentrat pipettiert und die Lösung für 5 bis 10 Sekunden, bis

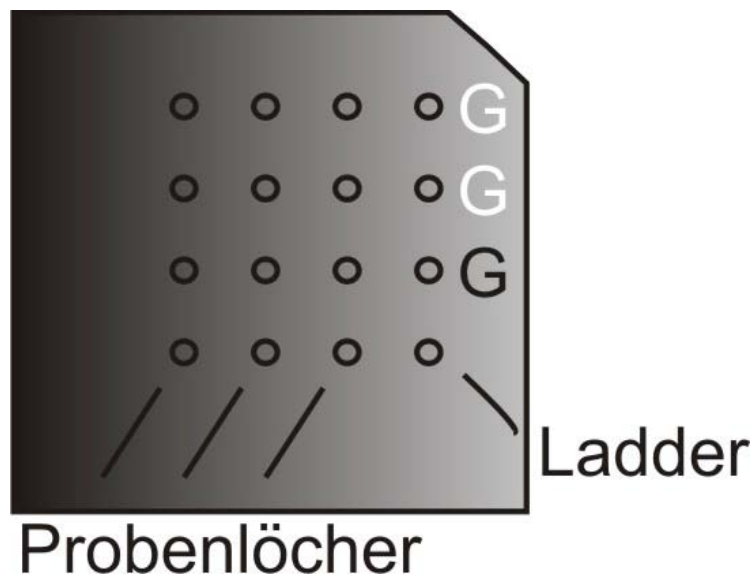
sie homogen war, gevortext. Abschließend wurde die Lösung auf einen mitgelieferten Spin-Filter pipettiert und bei 1500xg bei Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Gel-Dye-Mix konnte dann bei 4°C für 4 Wochen lichtgeschützt aufbewahrt werden, insofern er nicht direkt genutzt wurde oder aber ein Rest verblieb.

Im Folgenden wurde der DNA-Chip beladen (**Abbildung 13**). Dazu wurden zunächst DNA-Marker und –Ladder ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt und abschließend zentrifugiert. Der DNA-Dye-Mix musste auch aus dem Kühlschrank genommen und erwärmt werden, insofern dieser nicht gerade zuvor hergestellt worden war. Wichtig war es den DNA-Dye-Mix nicht zu zentrifugieren. Der Chip wurde entpackt und zunächst auf Brüche oder Fingerabdrücke und sonstige Verschmutzungen auf der Glaslinse untersucht. Lag nichts Derartiges vor, wurde der Chip in die sogenannte Chip-Füllungsstation eingebracht (**Abbildung 12**). Dort wurde der Chip zunächst mit 9µl Gel-Dye-Mix in Bohrloch „G“ beladen. Alle entstandenen Luftblasen wurden mit einer sauberen, sterilen Pipette entfernt. Mittels Druck über die, an der Füllungsstation angebrachten Spritze wurde der Gel-Dye-Mix für exakt 30 Sekunden in den Mikrokapillaren des Chips verteilt. Im Anschluss daran musste der Chip nochmals auf der Rückseite betrachtet werden, um Luftblasen, welche die Analyse beeinträchtigen würden, auszuschließen. Wiederum wurden je 9µl des Gel-Dye-Mix in die 2 Bohrlöcher „G“ pipettiert. Außerdem wurden je 5µl DNA-Marker in die 12 Proben-Bohrlöcher und das Ladder-Bohrloch pipettiert. Zuletzt wurden noch jeweils 1µl der 9 DNA-Proben in 9 der Probenlöcher pipettiert. Die 3 übrigen Löcher mussten ebenso befüllt werden, dazu wurden ausgewählte Proben dupliziert. Der Chip wurde in den Vortex-Adapter der Firma IKA Works eingesetzt und für 1 Minute auf höchster Stufe (2200) gevortext und abschließend in den Bioanalyzer eingesetzt und das Programm gestartet. Dieses dauerte insgesamt 1 Stunde. Im Anschluss daran konnte die Analyse mittels DiversiLab Software vorgenommen werden.

Abbildung 12: Fotografie der DiversiLab Füllstation aus „Instruction for use of LabChip® Devices, Fa. bioMérieux, Nürtingen, Deutschland [14].



Abbildung 13: Schematische Darstellung des Chips modifiziert nach „Instructions for Use of LabChip® Devices“, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland [14].



3.2.6 Resistenztestung der *A. terreus* Stämme für Amphotericin B mittels Epsilometer-Test

Mit den 9 isolierten *A. terreus*-Stämmen wurden nochmals Malzextraktagar-Nährböden beimpft. Für die Resistenztestung wurde der Epsilometer-Test oder kurz E-Test verwendet. Der E-Test ist eine mikrobiologische Methode zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Bakterien und Pilzen gegenüber Antibiotika und Antimykotika. Es handelt sich bei dem Test im Grunde eine Variante des Agardiffusionstests. Der E-Test basiert auf einem Papierstreifen, der mit einem Antibiotikum oder –mykotikum getränkt ist. Die Konzentration des Wirkstoffes nimmt vom Anfang des Streifens bis zu seinem Ende kontinuierlich (exponentiell) zu. Die in den verschiedenen Segmenten enthaltenen Wirkstoffkonzentrationen sind wie bei einem Lineal auf den Teststreifen aufgedruckt.

Jeweils ein E-Teststreifen wurde auf einen der Nährböden gelegt, der mit der zu untersuchenden Kultur beimpft wurde. Nach Bebrütung der Kulturen über 48 Stunden konnte die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Amphotericin B für die untersuchten *A. terreus* Stämme abgelesen werden. Sie entsprach der Konzentration, bei der die Hemmhof-Ellipse den Teststreifen überkreuzte.

3.2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mithilfe der Programme Microsoft Office 2007 (Microsoft Excel), SPSS Software (SPSS, version 16.0, SPSS; Chicago, IL), SigmaPlot 10, GraphPad Software und CorelDRAW X3 durchgeführt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Welch Zweistichproben t-Test für zwei unabhängige Stichproben verwendet. Ein möglicher Zusammenhang zwischen gegebenen meteorologischen Bedingungen und der Konzentration von *Aspergillus* spp. In der Luft wurde mittels einer multiplen linearen Regressionsanalyse der Daten berechnet. Vergleiche mit einem p Wert <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Gesamtzahl und species-abhängige Anzahl der isolierten Pilze im Innen- und Außenraum während der 12-monatigen Beobachtungsperiode

Während des Studienzeitraumes, welcher sich über 12 Monate – von Dezember 2007 bis einschließlich November 2008 – erstreckte, konnte im Innen- und Außenbereich eine Gesamtzahl von 4919 koloniebildender Einheiten (KBE) isoliert werden. Davon stammten insgesamt 2212 KBE aus dem Außenbereich der Uniklinik und 2707 KBE aus dem Innenbereich, welcher die hämatoonkologische Station sowie das Foyer umfasst. Im Foyer allein wurden 1335 KBE isoliert.

Von den insgesamt 4919 isolierten KBE handelte es sich bei 3617 KBE um *A. fumigatus*-Stämme. Davon wurden 1687 an den beiden Messpunkten im Außenbereich und 1930 Stämme im Innenbereich isoliert. Im Stationsbereich konnten 1109 und im Foyer 821 KBE isoliert werden.

Von *A. niger* konnten insgesamt 209 Stämme isoliert werden, davon stammten 122 aus dem Außenbereich und 44 Stämme aus dem stationären Bereich sowie 43 Stämme aus dem Foyer.

A. flavus war mit insgesamt 84 Stämmen, darunter 24 aus dem Außenbereich und 60 aus dem Innenbereich, von welchen 58 aus dem Foyer stammen, vertreten.

Neun *A. terreus*-Stämme wurden in der gesamten Beobachtungsperiode isoliert. Drei Stämme wurden im Außen- und 6 Stämme im Innenbereich isoliert. Die folgende Tabelle zeigt Ort und Zeit der Isolation der 9 Stämme.

Tabelle 9: Zuordnung der Probennummer der *A. terreus*-Isolate zu Ort und Zeitpunkt der Isolation.

Probennummer	Monat	Ort
1	November	Foyer
2	November	Park
3	November	Park
4	Dezember	Park
5	Juni	Materialwaretransport
6	November	Foyer
7	Juni	Materialwaretransport
8	November	Foyer
9	November	Foyer

4.2 Prozentualer Anteil der einzelnen Pilzstämme an der Gesamtzahl der im Studienzeitraum isolierten Pilze

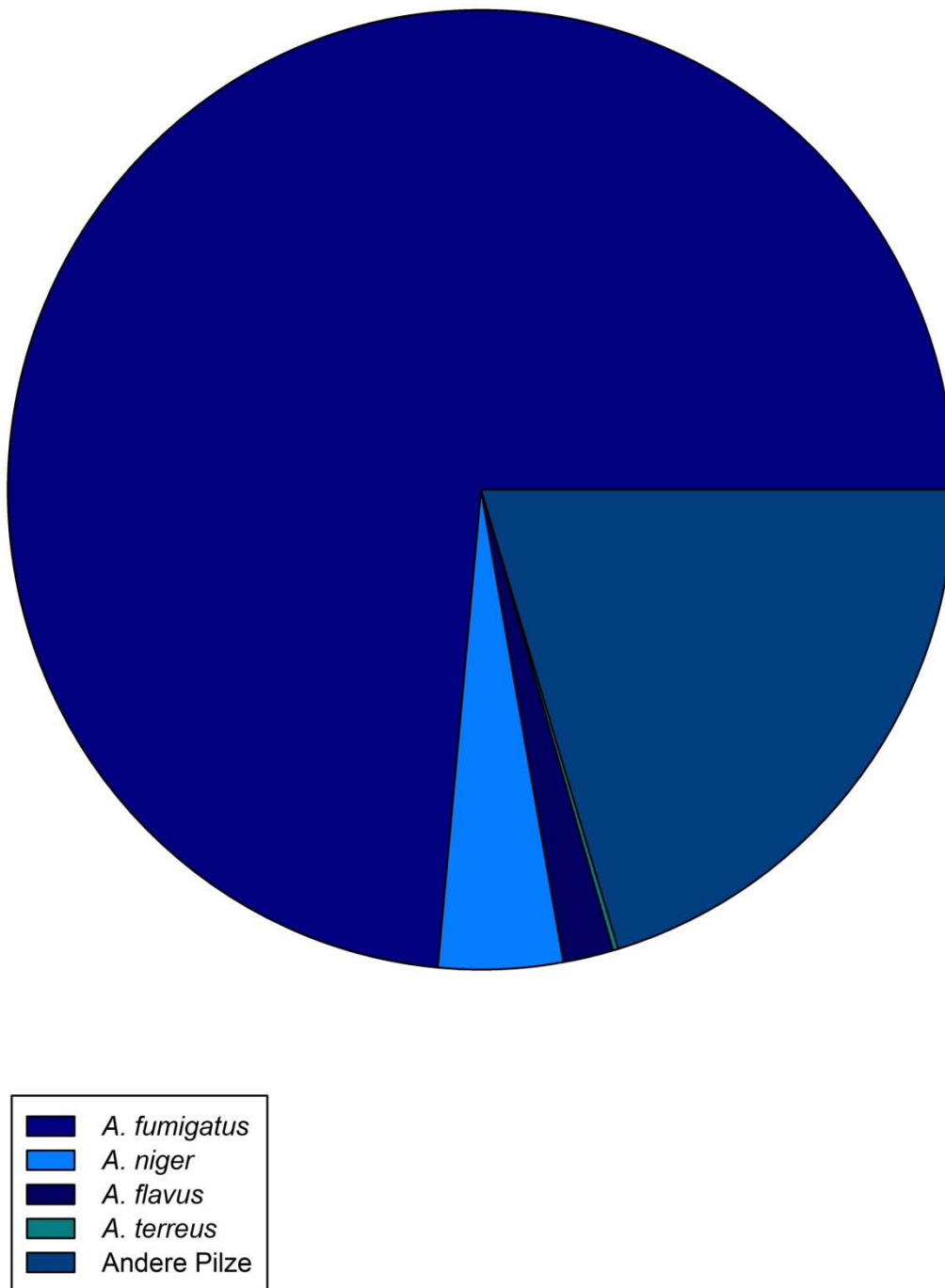
Im gesamten Beobachtungszeitraum der Studie konnte eine Gesamtzahl von 4919 KBE isoliert werden. Dazu gehörten KBE der *Aspergillus* spp.-Unterarten *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* und *A. terreus* sowie andere Pilze, welche nicht näher identifiziert wurden und dementsprechend in dieser Kategorie verzeichnet wurden.

Für die genannten Pilze ergeben sich nun folgende prozentuale Anteile an der Gesamtzahl isolierter KBE:

Tabelle 10: Prozentualer Anteil der einzelnen Pilz-Arten an der Gesamtzahl der im Studienzeitraum isolierten Pilze.

Species	Absolute Anzahl	Prozentualer Anteil
<i>A. fumigatus</i>	3617	73,5%
<i>A. niger</i>	209	4,3%
<i>A. flavus</i>	84	1,7%
<i>A. terreus</i>	9	0,2%
andere Pilze (nicht näher identifiziert)	1000	20,3%

Abbildung 14: Prozentualer Anteil der einzelnen Pilz-Arten an der Gesamtzahl der im Studienzeitraum isolierten Pilze.

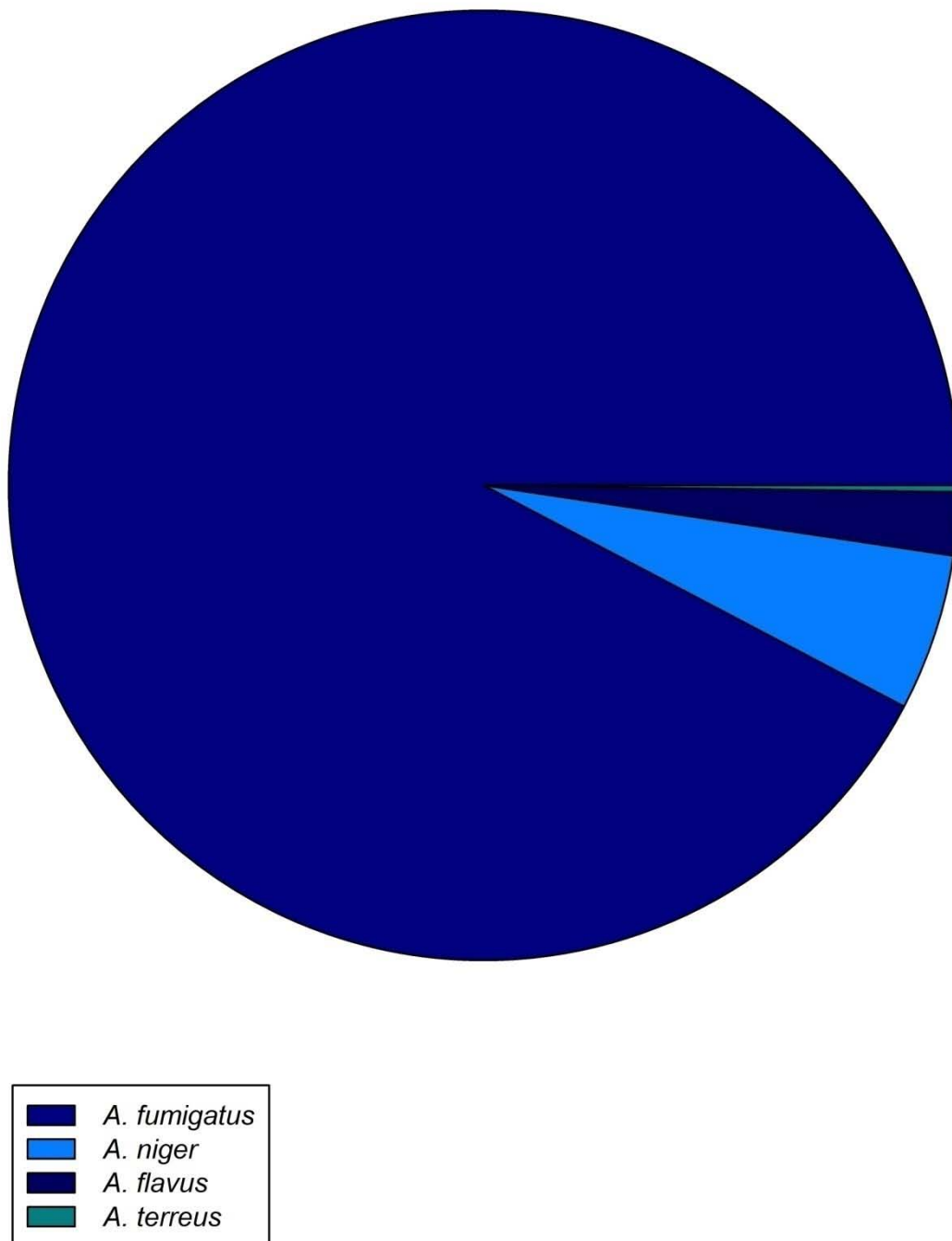


Nach Ausschluss der 1000 isolierten KBE der nicht näher identifizierten Pilze ergibt sich eine Gesamtzahl der *Aspergillus* spp.-KBE von nunmehr 3919 KBE für den Studienzeitraum. Für die vier im Mittelpunkt der Untersuchung stehenden Arten ergeben sich folgende prozentuale Anteile an der Gesamtzahl der im Studienzeitraum isolierten *Aspergillus* spp:

Tabelle 11: Prozentualer Anteil der ausgewählter Aspergillus-Arten an der Gesamtzahl der im Studienzeitraum isolierten *Aspergillus* spp..

<i>A. fumigatus</i>	92,3%
<i>A. niger</i>	5,3%
<i>A. flavus</i>	2,1%
<i>A. terreus</i>	0,2%

Abbildung 15: Prozentualer Anteil ausgewählter Aspergillus-Arten an der Gesamtzahl der im Studienzeitraum isolierten Pilze nach Ausschluss der nicht näher identifizierten Pilze.



4.3 Absolute Zahl der ausgewählten Aspergillus-Arten und der nicht näher identifizierten Pilze je Messpunkt

Die folgende Tabelle zeigt eine Auflistung der während der gesamten Beobachtungsperiode isolierten Aspergillus-Arten und anderer nicht weiter identifizierter Pilze. Diese werden getrennt nach Art und Messpunkt dargestellt.

Tabelle 12: Den Messpunkten entsprechende Verteilung von *Aspergillus fumigatus*, *niger*, *flavus* und *terreus* sowie anderen nicht näher identifizierten Pilzen.

Messpunkt	KBE <i>A. fumigatus</i>	KBE <i>A. niger</i>	KBE <i>A. flavus</i>	KBE <i>A. terreus</i>	KBE andere Pilze (nicht näher identifiziert)
1 (außen)	805	61	14	0	183
2 (außen)	882	61	10	3	197
3 (Foyer)	761	40	56	4	340
4 (Station Personenaufzug)	243	10	0	0	39
5 (Station Bettenaufzug)	345	11	2	0	124
6 (Station MWT)	249	16	2	2	54
7 (Station Gang)	183	3	0	0	34
8 (Isolierstation)	149	7	0	0	29

4.4 Konzentration von *Aspergillus* spp. in der Außenluft während der 12-monatigen Beobachtungsperiode

Die Konzentration von *Aspergillus* spp. im Außenbereich erreichte mit 4,4 KBE/m³ im Juni ihren Tiefpunkt und mit 37,4 KBE/m³ im November ihren Höhepunkt. Die Werte für die übrigen 10 Monate im Einzelnen sind der folgenden Abbildung zu entnehmen.

Tabelle 13: Durchschnittliche Anzahl KBE/m³ je Monat in der Außenluft und Standardabweichung.

Monat	Anzahl der durchschnittlichen KBE/m ³ je Monat	Standardabweichung
Dezember 07	22,6	3,1
Januar 08	15,1	0,9
Februar 08	13,7	15,9
März 08	9,8	2,8
April 08	12,4	6,2
Mai 08	8,2	3,8
Juni 08	4,4	4,5
Juli 08	16,3	27,1
August 08	21,5	4,2
September 08	27,9	10,4
Oktober 08	20	4,2
November 08	37,4	4,9

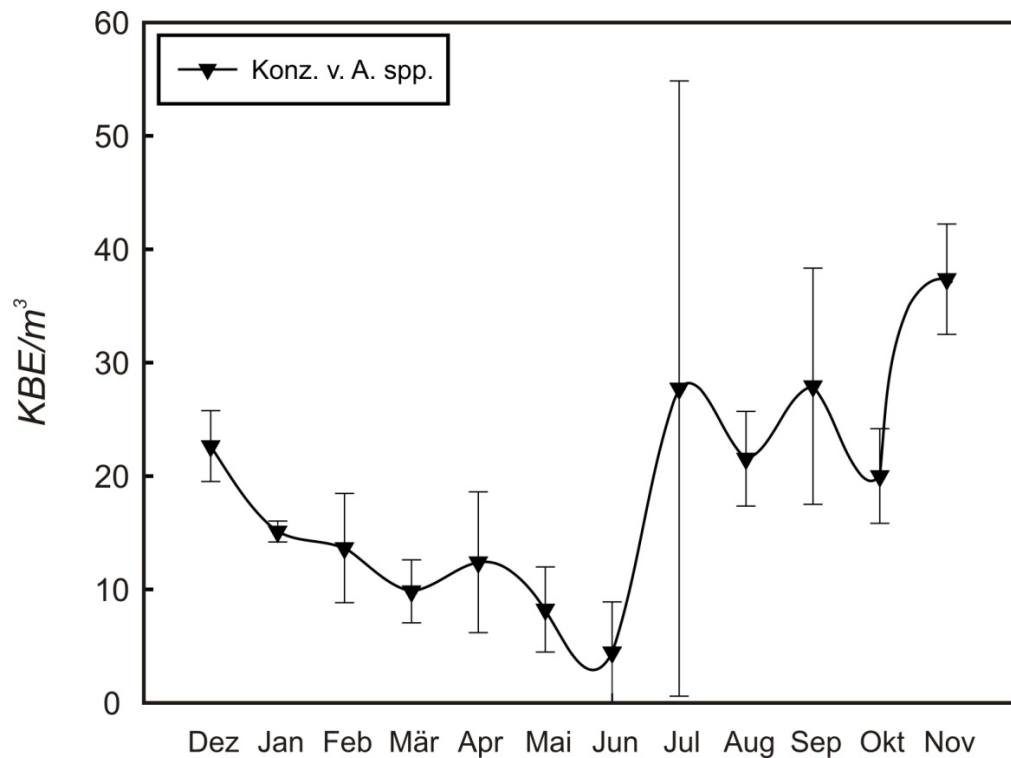
Für jene Werte der durchschnittlichen KBE/m³ je Monat ergeben sich im Jahres- und auch Jahreszeitenverlauf folgende Beobachtungen:

Von Dezember bis Juni, d. h. über die Wintermonate und Frühjahrsmonate hinweg nahm die Dichte von *Aspergillus* spp. je Monat stetig ab, mit Erreichen des Tiefpunktes im Juni, in welchem eine Dichte von 4,4 KBE/m³ gemessen wurde.

Ab Juli begannen die Konzentrationen zu steigen und erreichten über die Sommermonate und Herbstmonate hinweg im November ihren Höhepunkt mit 37,4 KBE/m³.

Im Mittel ergab sich für die Konzentration von *Aspergillus* spp. im Außenbereich innerhalb der 12 Monate ein Wert von 17,5 KBE/m³ je Monat.

Abbildung 16: Mittlere Konzentration von *Aspergillus* spp. je Monat im Außenbereich des Uniklinikums Köln innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes.



4.5 Konzentration von *Aspergillus* spp. in den Innenräumen der hämatoonkologischen Station im Bettenhaus der Uniklinik Köln während der 12-monatigen Beobachtungsperiode

Für die Messungen im Innenraum ergaben sich folgende Werte und Abbildung:

Die Dichte von *Aspergillus* spp. im Innenraum reichte von 2,0 KBE/m³ bis hin zu 11,6 KBE/m³.

Tabelle 14: Durchschnittliche Anzahl KBE/m³ je Monat auf der hämatoonkologischen Station und Standardabweichung.

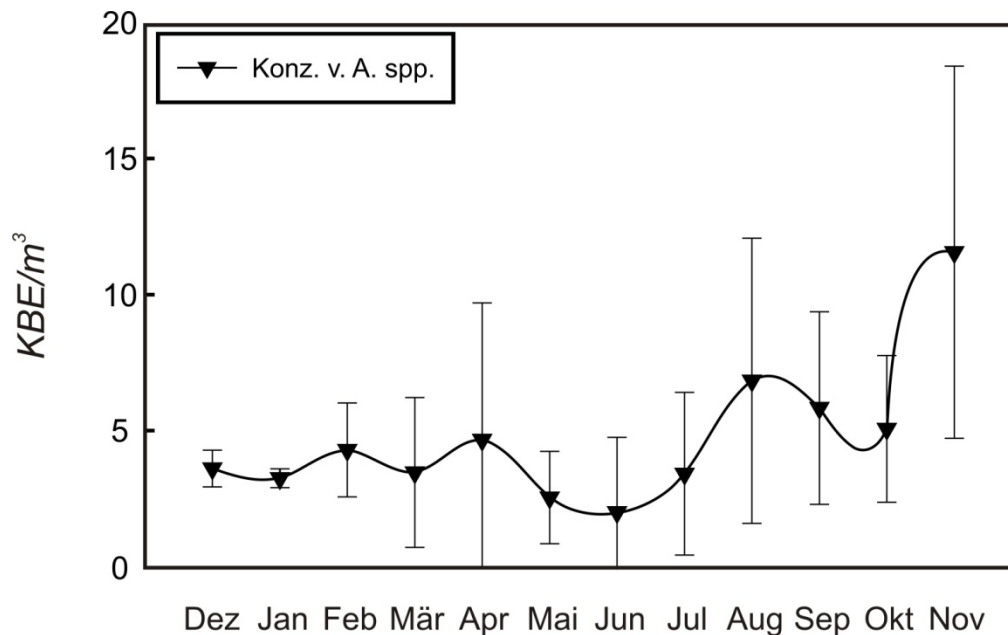
Monat	Anzahl der durchschnittlichen KBE je Monat	Standardabweichung
Dezember 07	3,6	0,7
Januar 08	3,3	0,3
Februar 08	4,3	1,7
März 08	3,5	2,8
April 08	4,7	5,0
Mai 08	2,5	1,7
Juni 08	2	2,8
Juli 08	2,6	3,0
August 08	6,8	5,2
September 08	5,8	3,5
Oktober 08	5,1	2,7
November 08	11,6	6,8

Zum Messbeginn im Winter - Dezember 2007 - schwankten die Werte über die Wintermonate und auch die Frühjahrsmonate hindurch stets in einem Bereich von 3,3 KBE/m³ bis 4,7 KBE/m³. Im Mai und Juni fiel die initial, im Vergleich zu den erhobenen Ergebnissen im Außenbereich eher niedrige Konzentration, nochmals ab und erreichte im Juni mit 2,0 KBE/m³ ihren Tiefpunkt.

Ab Juli stieg die Konzentration leicht an. Im September und Oktober nahm sie jedoch wieder ab und letztlich wurde im November ein Wert von 11,6 KBE/m³ verzeichnet.

Die Anzahl der KBE/m³ pro Monat auf der Station lag im Mittel für den kompletten Beobachtungszeitraum bei einem Wert von 4,6 KBE/m³.

Abbildung 17: Mittlere Konzentration von *Aspergillus* spp. je Monat im Innenbereich der Uniklinik Köln innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes.



4.6 Vergleich der Konzentrationen von *Aspergillus* spp. im Außen- und Innenbereich der UniKlinik Köln

Ein Vergleich der Ergebnisse des Innenbereichs (**Abbildung 17**) mit den Ergebnissen aus dem Außenbereich (**Abbildung 16**) zeigte eine Ähnlichkeit im Verlauf beider Kurven, insbesondere bezogen auf die Höhepunkte, welche nicht für den Zahlenwert identisch, aber für den Zeitpunkt bzw. Monat identisch waren.

Die durchschnittliche Anzahl der KBE/m³ pro Monat auf der Station war signifikant geringer als die durchschnittlich isolierten KBE/m³/Monat im Außenbereich (**Abbildung 18**). Die Anzahl der KBE/m³ pro Monat auf der Station lag im Mittel für den kompletten Beobachtungszeitraum bei einem Wert von 4,6 KBE/m³. Für den Außenbereich ergab sich wie bereits erwähnt im Mittel für die Konzentration von *Aspergillus* spp. innerhalb der 12 Monate ein Wert von 17,5 KBE/m³ je Monat.

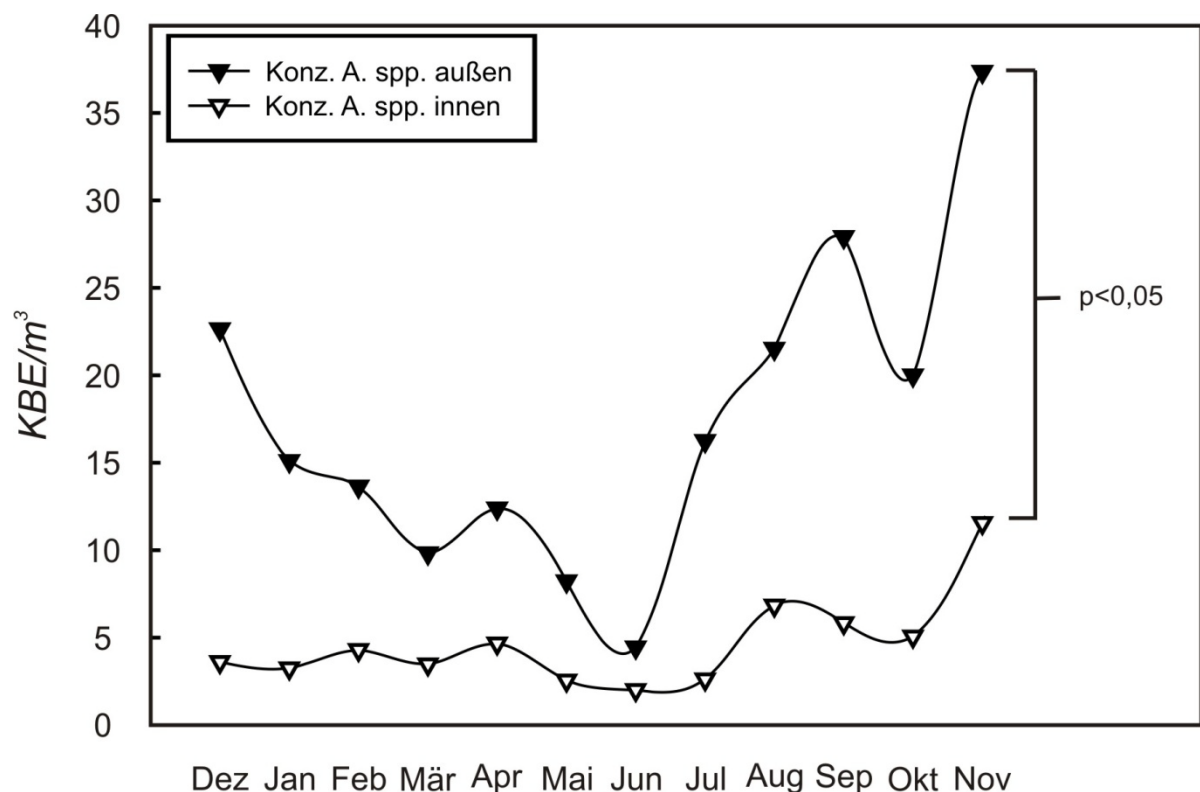
Im Außenbereich wurden durchschnittlich 12,9 KBE/m³ mehr isoliert werden.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied ($p=0,0005$).

Tabelle 15: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl KBE/m³ je Monat der Außenluft und der hämatoonkologischen Station.

Monat	durchschnittliche KBE Außenbereich	durchschnittlichen KBE hämatoonkolog. Station
Dezember 07	22,6	3,6
Januar 08	15,1	3,3
Februar 08	13,7	4,3
März 08	9,8	3,5
April 08	12,4	4,7
Mai 08	8,2	2,5
Juni 08	4,4	2
Juli 08	16,3	2,6
August 08	21,5	6,8
September 08	27,9	5,8
Oktober 08	20	5,1
November 08	37,4	11,6

Abbildung 18: Vergleich der mittleren Konzentrationen von *Aspergillus* spp. des Außenbereiches mit den Ergebnissen für den Innenraum je Monat innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes mittels des Welch Zweistichproben t-Test für zwei unabhängige Stichproben. Vergleiche mit einem p Wert <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.



4.7 Konzentration von *Aspergillus* spp. an den einzelnen Messpunkten auf der hämatoonkologischen Station

4.7.1 Normalstation

Die hämatoonkologische Station auf Ebene 13 des Bettenhauses der Uniklinik Köln wurde als Normalstation bezeichnet, um diese von der Isolierstation, welche sich ebenso auf Ebene 13 befand und auf welcher sich die Patienten zur Stammzelltransplantation befanden, zu differenzieren. Insgesamt wurden 4 Messpunkte zur Normalstation gezählt. Es handelt sich dabei um die im Methodenteil beschriebenen Messpunkte 4, 5, 6 und 7. Die Werte für die Konzentration von *Aspergillus* spp. auf der Normalstation reichten von 2,1 KBE/m³ bis hin zu 13,8 KBE/m³. Der niedrigste Wert wurde im Juni gemessen, der höchste Wert im November.

Zu Beginn der Messungen im Dezember 2007 bis einschließlich April des darauffolgenden Jahres wurden Dichtewerte im Bereich von 4,4 KBE/m³ bis 6,0 KBE/m³ aufgezeichnet.

Im Mai wurde mit 3,1 KBE/m³ ein Rückgang der Konzentration verzeichnet, welcher sich bis Juni 2008 abzeichnete, wo schließlich, wie bereits beschrieben, die niedrigste KBE-Zahl isoliert wurde.

Im Juli 2008 wurden im Mittel 4,3 KBE/m³ isoliert.

Im August konnte mit 8,2 KBE/m³ beinahe eine Verdopplung der KBE/m³ beobachtet werden.

Im September und Oktober befand sich die KBE/m³ in einem ähnlichen Bereich wie im August.

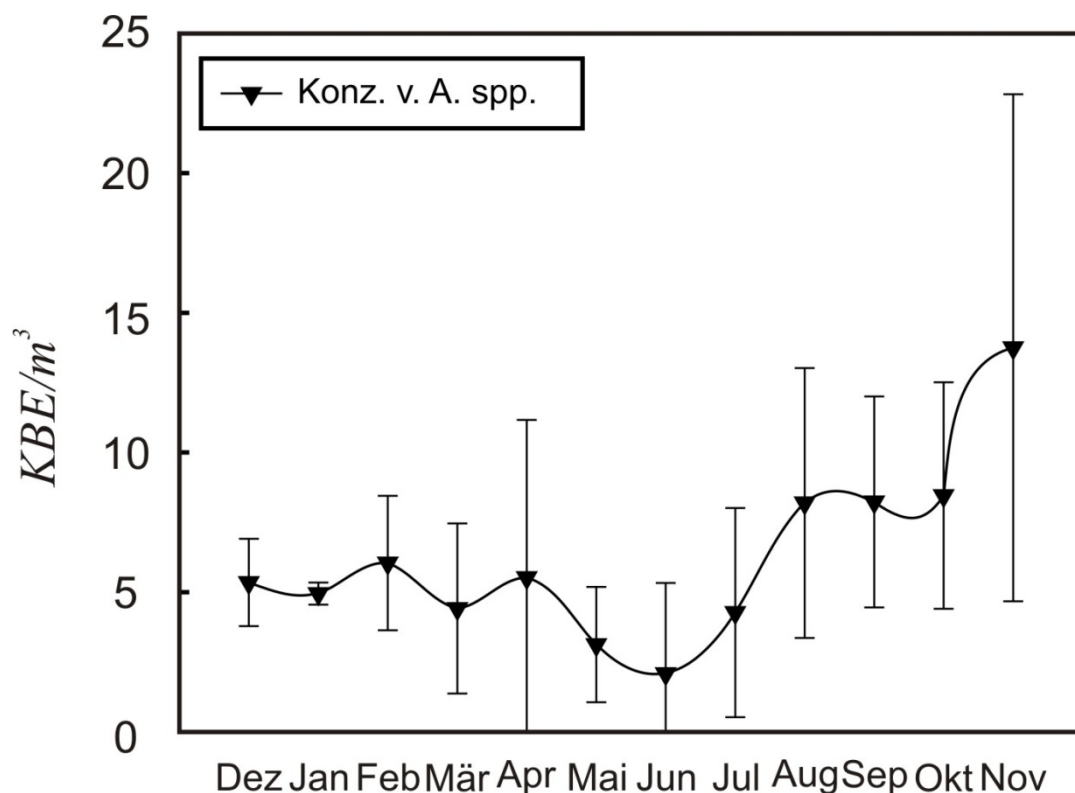
Im November schließlich erreichte die KBE-Zahl ihren Maximalwert mit 13,8 KBE/m³.

Für die Jahreszeiten ergaben sich aus den Werten der einzelnen Monate folgende Zahlen: Winter: 5,4 KBE/m³; Frühling: 4,3 KBE/m³; Sommer: 4,9 KBE/m³; Herbst: 10,2 KBE/m³. Für den gesamten Beobachtungszeitraum wurde eine durchschnittliche KBE-Anzahl von 6,2 KBE/m³ errechnet.

Tabelle 16: Durchschnittliche Anzahl KBE/m³ je Monat auf der Normalstation und Standardabweichung.

Monat	Anzahl der durchschnittlichen KBE je Monat	Standardabweichung
Dezember 07	5,3	1,6
Januar 08	5	0,4
Februar 08	6	2,4
März 08	4,4	3,0
April 08	5,5	5,6
Mai 08	3,1	2,1
Juni 08	2,1	3,2
Juli 08	4,3	3,7
August 08	8,2	4,8
September 08	8,2	3,8
Oktober 08	8,5	4,1
November 08	13,8	9,1

Abbildung 19: Mittlere Konzentration von *Aspergillus* spp. je Monat auf der Normalstation der Uniklinik Köln innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes. Zur Normalstation zählen die Messpunkte 4, 5, 6 und 7. Es handelt sich dabei um 2 Messpunkte vor den Personenaufzügen, einer auf dem Gang der Station und einem Messpunkt im Materialwaretransport.



4.7.2 Stammzelltransplantationsstation (Isolierstation, KMT)

Die isolierte Anzahl koloniebildender Einheiten im Bereich der Isolierstation reichte von 1,7 KBE/m³ bis zu 8,1 KBE/m³. Die niedrigste Anzahl wurde im Mai 2008, die höchste Anzahl im August 2008 isoliert.

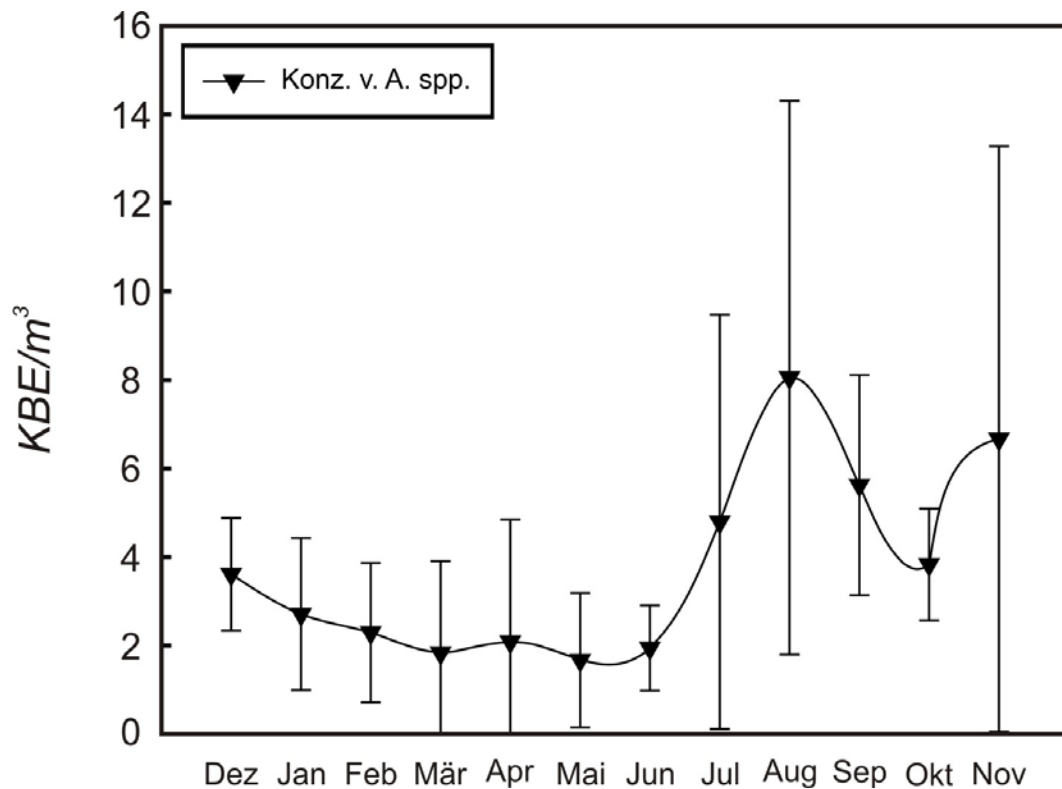
Tabelle 17: Durchschnittliche Anzahl KBE/m³ je Monat auf der KMT sowie Standardabweichung.

Monat	Anzahl der durchschnittlichen KBE je Monat	Standardabweichung
Dezember 07	3,6	1,3
Januar 08	2,7	1,7
Februar 08	2,3	1,6
März 08	1,8	2,1
April 08	2,1	2,8
Mai 08	1,7	1,5
Juni 08	1,9	1,0
Juli 08	4,8	4,7
August 08	8,1	6,3
September 08	5,6	2,5
Oktober 08	3,8	1,3
November 08	6,7	6,6

In den Wintermonaten lag die durchschnittliche KBE-Zahl bei 2,9 KBE/m³. Im Frühjahr konnten im Mittel 1,9 KBE/m³ und im Sommer 4,9 KBE/m³ isoliert werden. Im Herbst betrug die durchschnittliche KBE-Zahl 5,4 KBE/m³.

Für das gesamte Jahr wurde eine durchschnittliche KBE-Zahl von 3,8 KBE/m³ errechnet.

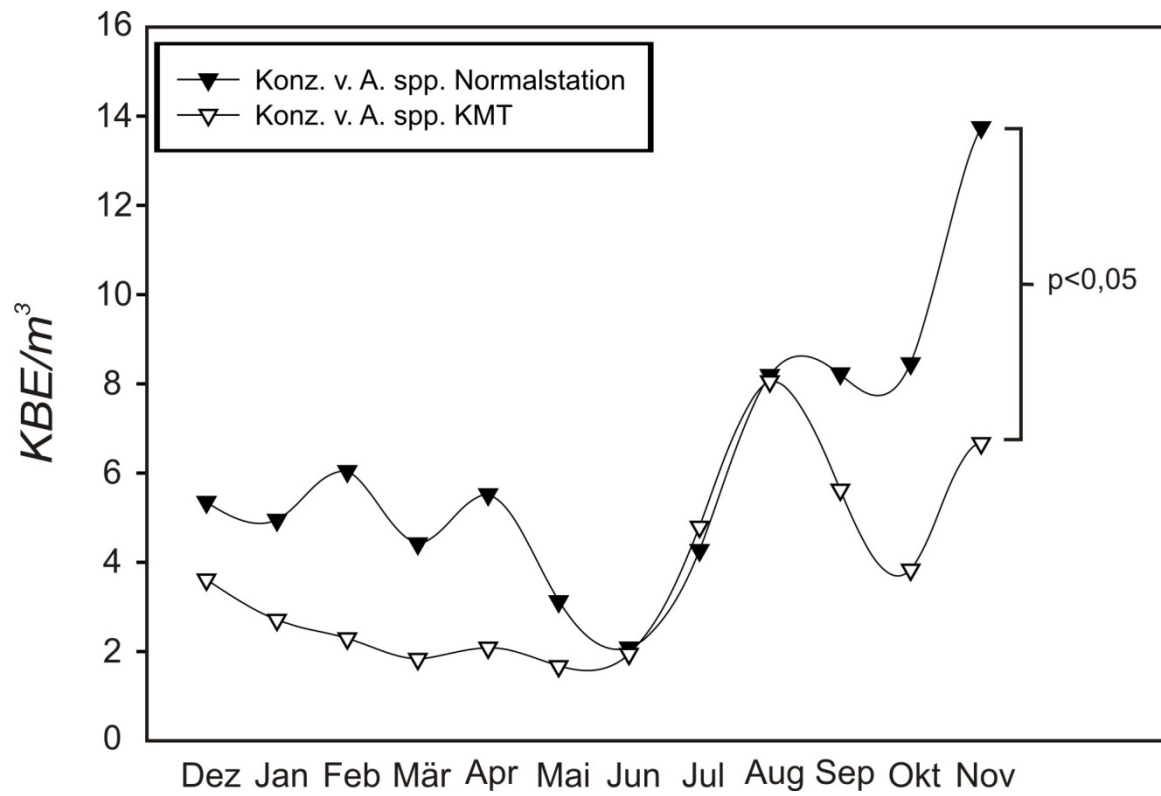
Abbildung 20: Mittlere Konzentration von *Aspergillus* spp. je Monat auf der Isolierstation der Uniklinik Köln innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes.



4.7.3 Vergleich von Normalstation und Stammzelltransplantationsstation

Ein Vergleich (**Abbildung 21**) der Ergebnisse der Normalstation (**Abbildung 19**) mit jenen der Stammzelltransplantationsstation (**Abbildung 20**) verdeutlicht auf den ersten Blick, dass die Anzahl der KBE/m³ im Bereich der Isolierstation mit Ausnahme des Julis stets niedriger war als jene auf der „offenen“ Normalstation.

Abbildung 21: Vergleich der mittleren Konzentrationen von *Aspergillus* spp. auf der Normalstation mit den Ergebnissen für die KMT-Station je Monat innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes mittels des Welch Zweistichproben t-Test für zwei unabhängige Stichproben. Vergleiche mit einem p Wert <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.



Die im Beobachtungszeitraum durchschnittlich isolierte Anzahl KBE/m³ je Monat betrug für die Normalstation 6,2 KBE/m³ und für die Isolierstation 3,8 KBE/m³. Hieraus ergibt sich eine Differenz von 2,4 KBE/m³.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied (p=0,0375).

Tabelle 18: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl KBE/m³ je Monat in der Luft der Normalstation und der KMT.

Monat	durchschnittlichen KBE Normalstation	durchschnittlichen KBE KMT
Dezember 07	5,3	3,6
Januar 08	5	2,7
Februar 08	6	2,3
März 08	4,4	1,8
April 08	5,5	2,1
Mai 08	3,1	1,7
Juni 08	2,1	1,9
Juli 08	4,3	4,8
August 08	8,2	8,1
September 08	8,2	5,6
Oktober 08	8,5	3,8
November 08	13,8	6,7

4.7.4 Anzahl der KBE/m³ je Monat im Bereich der Aufzüge

Zu den Aufzügen zählten die Personen- bzw. Bettenaufzüge sowie die Aufzüge im Bereich des Materialwarentransportes. Die niedrigste Konzentration, welche verzeichnet werden konnte betrug 2,0 KBE/m³ im Juni. Im November wurde mit 16,8 KBE/m³ die höchste Konzentration koloniebildender Einheiten von *Aspergillus* spp. beobachtet.

Tabelle 19: Durchschnittliche Anzahl KBE/m³ je Monat in der Umgebungsluft der Aufzüge sowie Standardabweichung.

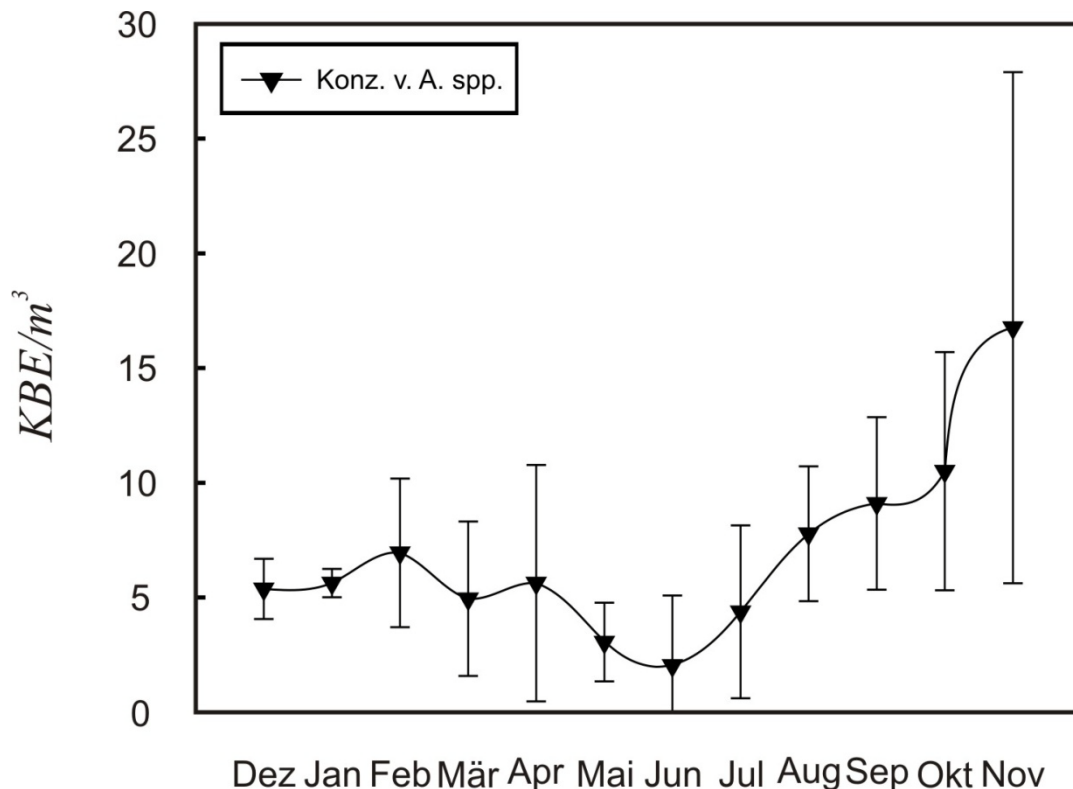
Monat	Anzahl der durchschnittlichen KBE je Monat	Standardabweichung
Dezember 07	5,4	1,3
Januar 08	5,6	0,6
Februar 08	6,9	3,2
März 08	4,9	3,4
April 08	5,6	5,2
Mai 08	3,1	1,7
Juni 08	2,0	3,0
Juli 08	4,4	3,8
August 08	7,8	2,9
September 08	9,1	3,8
Oktober 08	10,5	5,2
November 08	16,8	11,1

Zu Beginn der Beobachtungsperiode, in den Winter- und Frühjahrsmonaten, befanden sich die Werte für die Konzentration von *Aspergillus* spp. im Bereich zwischen 3,1 KBE/m³ und 6,9 KBE/m³. Im Monat Mai wurden 3,1 KBE/m³ gemessen

und somit eine erste Verminderung der KBE/m³ registriert. Die Anzahl der KBE/m³ nahm im Juni nochmals ab.

Im Juli wurde bereits mehr als eine Verdopplung der KBE-Zahl/m³ beobachtet. Bis zum November 2008 konnte eine stetige Zunahme der KBE/m³ beobachtet werden.

Abbildung 22: Mittlere Konzentration von *Aspergillus* spp. je Monat vor den Aufzügen der Station 13 des Bettenhauses der Uniklinik Köln innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes. Dazu zählen insgesamt 3 Messpunkte, 2 vor den Personen- und Bettenaufzügen und einer vor den Aufzügen im Bereich des Materialwarentportes.



Für die Wintermonate ergab sich ein Mittelwert von 6,0 KBE/m³, für den Frühling konnte im Mittel eine KBE-Zahl von 4,5 KBE/m³ errechnet werden, für den Sommer ergab sich eine Zahl von 4,7 KBE/m³ und für den Herbst wurde eine mittlere KBE-Zahl von 12,1 KBE/m³ ermittelt.

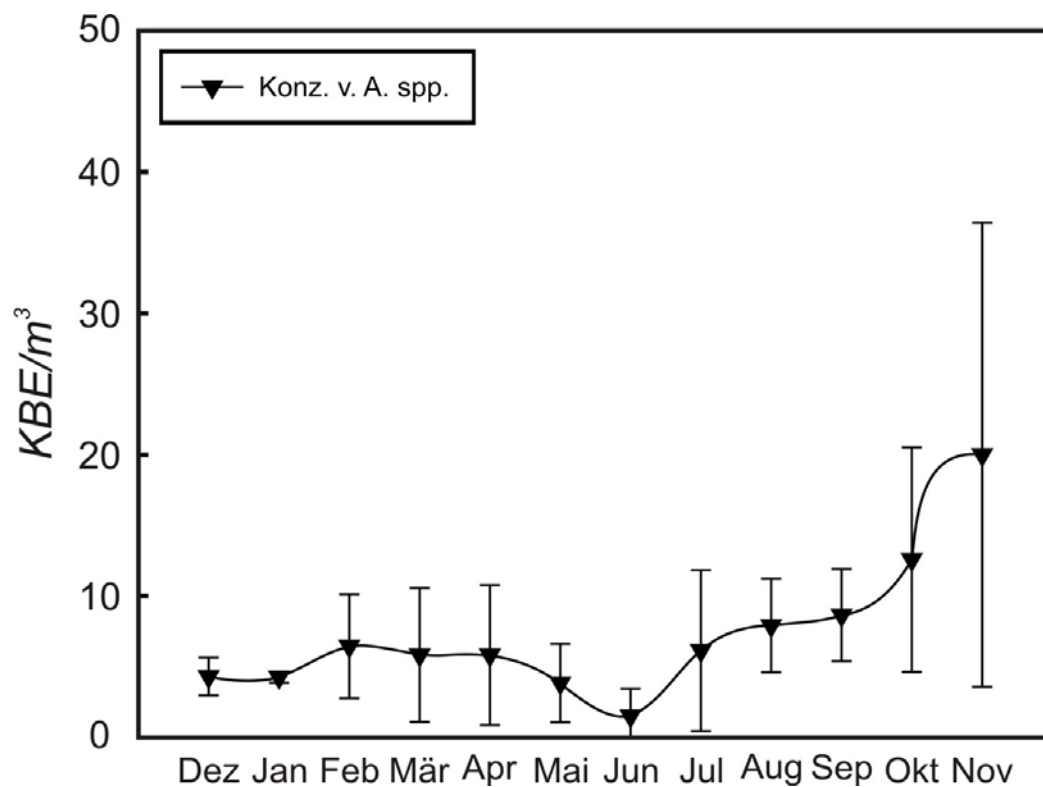
Im Mittel wurden im gesamten Beobachtungszeitraum im Bereich der Aufzüge 6,8 KBE/m³ je Monat isoliert.

4.7.5 Personen- und Bettenaufzüge

Der Bereich der Personen- und Bettenaufzüge umfasste 2 Messpunkte. Die im Mittel je Monat isolierte KBE-Zahl betrug 7,3 KBE/m³.

Der Kurvenverlauf gestaltet sich ähnlich wie jener der Abbildung 11, welche den Verlauf der Konzentration von *Aspergillus* spp. für die Aufzüge insgesamt innerhalb der Beobachtungsperiode wiedergibt.

Abbildung 23: Mittlere Konzentration von *Aspergillus* spp. je Monat vor den Personenaufzügen der Ebene 13 des Bettenhauses des Uniklinikums Köln innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes.



Der kleinste Wert wurde mit 1,5 KBE/m³ im Juni und der größte Wert mit 20,0 KBE/m³ im November verzeichnet.

Tabelle 20: Durchschnittliche Anzahl KBE/m³ je Monat in der Umgebungsluft der Personen- und Bettenaufzüge sowie Standardabweichung.

Monat	Anzahl der durchschnittlichen KBE je Monat	Standardabweichung
Dezember 07	4,3	1,3
Januar 08	4,3	0,4
Februar 08	6,5	3,7
März 08	5,8	4,7
April 08	5,8	4,9
Mai 08	3,9	2,8
Juni 08	1,5	1,9
Juli 08	6,1	5,7
August 08	7,9	3,3
September 08	8,6	3,3
Oktober 08	12,6	7,9
November 08	20	16,4

Für den Winter ergab sich ein Mittelwert von 5,0 KBE/m³. Im Frühjahr und im Sommer konnten durchschnittlich 5,2 KBE/m³ aus der Luft isoliert werden. Für den Herbst wurde mit 13,7 KBE/m³ der größte Mittelwert errechnet.

4.7.6 Materialwaretransport

In den ersten drei Monaten der Beobachtungsperiode wurden Werte für die Konzentration von *Aspergillus* spp. im Bereich von 7,5 bis 8,3 KBE/m³ erhoben. Für den Winter ergibt sich somit ein Mittelwert von 7,9 KBE/m³.

Über die Frühjahrsmonate bis hin zum Sommermonat Juli ließ sich ein Rückgang der KBE/m³ Luft verzeichnen mit einem Tiefpunkt im Juli (0,8 KBE/m³). Für das Frühjahr wurde ein Mittelwert von 3,3 KBE/m³ und für den Sommer ein Mittelwert von 3,8 KBE/m³ ermittelt.

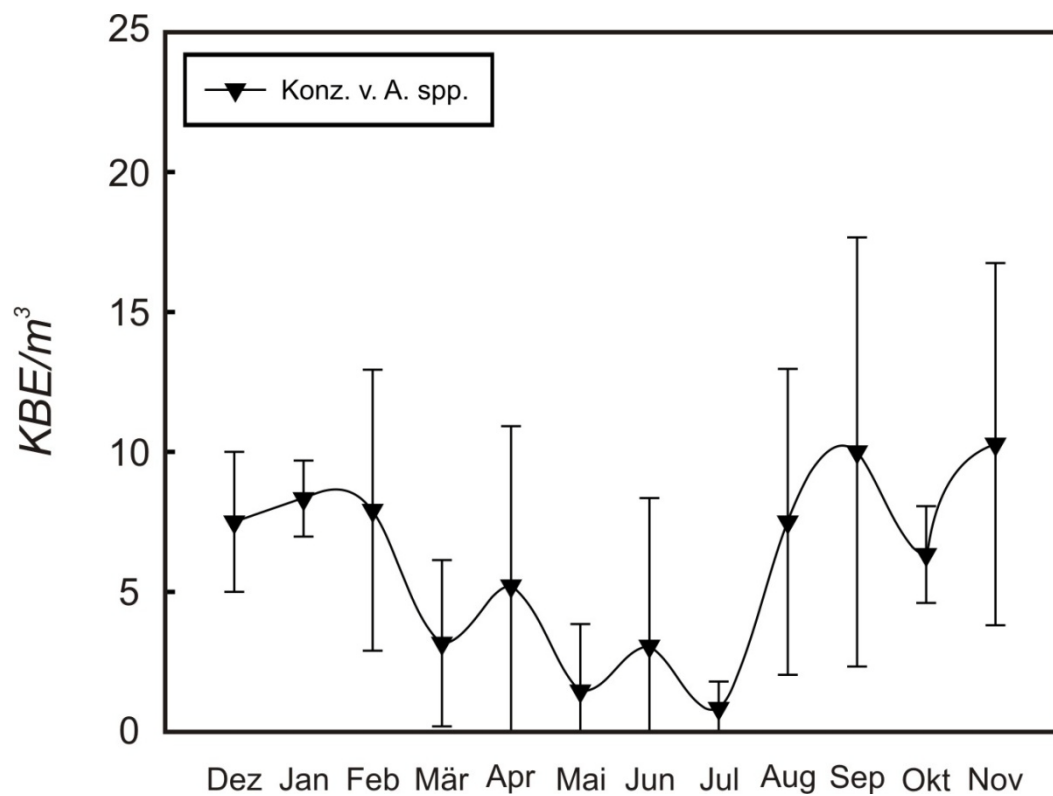
Im August wurde wieder eine Zunahme der KBE-Zahl beobachtet, welche sich ebenso über den September erstreckte. Im Oktober war die Konzentration nochmals geringer, erreichte jedoch schließlich im November mit 10,3 KBE/m³ Ihren Maximalwert für den Beobachtungszeitraum.

Die durchschnittliche je Monat isolierte Anzahl KBE/m³ Luft betrug 6,0 KBE/m³.

Tabelle 21: Durchschnittliche Anzahl KBE/m³ je Monat in der Umgebungsluft des MWTs sowie Standardabweichung.

Monat	Anzahl der durchschnittlichen KBE je Monat	Standardabweichung
Dezember 07	7,5	2,5
Januar 08	8,3	1,4
Februar 08	7,9	5,0
März 08	3,2	3,0
April 08	5,2	5,7
Mai 08	1,5	2,4
Juni 08	3,7	5,3
Juli 08	0,8	1,0
August 08	7,5	5,5
September 08	10	7,7
Oktober 08	6,3	1,7
November 08	10,3	6,5

Abbildung 24: Mittlere Konzentration von *Aspergillus* spp. je Monat vor den Aufzügen des Materialwarentransportes der Ebene 13 des Bettenhauses der Uniklinik Köln innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes.



4.7.7 Vergleich der Personen- und Bettenaufzüge mit dem Materialwarentransportbereich

Der Vergleich (**Abbildung 25**) der Ergebnisse der Messpunkte aus dem Bereich der Personen- und Bettenaufzüge (**Abbildung 23**) mit den Ergebnissen aus dem Bereich des Materialwarentransportes (MWT) (**Abbildung 24**) zeigt einen ähnlichen Verlauf der beiden Kurven.

An beiden Standorten konnte jeweils in den Frühjahrsmonaten ein Rückgang der KBE/m³ Luft mit einem darauffolgenden Anstieg der Anzahl im Sommer und Herbst beobachtet werden.

Die im Mittel isolierte Anzahl KBE/m³ war im Bereich des MWT während der Wintermonate zunächst größer als jene im Bereich der Personen- und Bettenaufzüge. Im Mittel wurden im Bereich des MWT 2,9 KBE/m³ mehr isoliert.

In den Frühjahrs- und Sommermonaten lag die isolierte Anzahl KBE/m³ im Bereich des MWT mit Ausnahme des Junis deutlich unter jener Zahl, welche im Bereich der Personen- und Bettenaufzüge isoliert werden konnte. Im Frühjahr waren dies im Mittel 1,9 KBE/m³ und im Sommer 1,4 KBE/m³ weniger.

Gleiches gilt für den Herbst, mit Ausnahme des Septembers. Im Herbst wurden im Mittel 4,8 KBE/m³ isoliert.

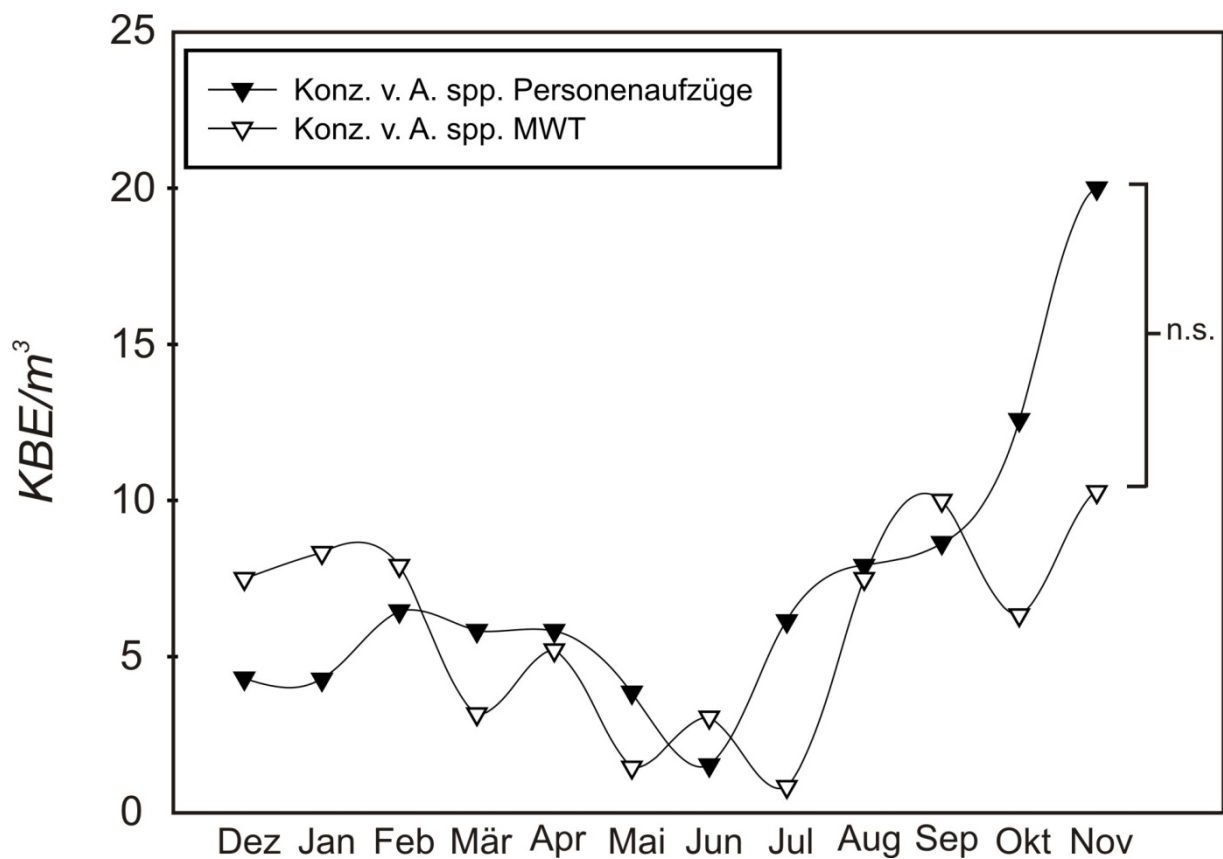
Für das gesamte Jahr errechnete sich, dass je Monat im Bereich des MWT 1,3 KBE/m³ weniger isoliert wurden als im Bereich der Personen- und Bettenaufzüge.

Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 22: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl KBE/m³ je Monat in der Umgebungsluft der Personen- und Bettenaufzüge und des MWTs.

Monat	durchschnittlichen KBE Personenaufzüge	durchschnittlichen KBE MWT
Dezember 07	4,3	7,5
Januar 08	4,3	8,3
Februar 08	6,5	7,9
März 08	5,8	3,2
April 08	5,8	5,2
Mai 08	3,9	1,5
Juni 08	1,5	3,7
Juli 08	6,1	0,8
August 08	7,9	7,5
September 08	8,6	10
Oktober 08	12,6	6,3
November 08	20	10,3

Abbildung 25: Vergleich der mittleren Konzentrationen von *Aspergillus* spp. vor den Personenaufzügen mit den Ergebnissen für den Bereich des Materialwarentransportes je Monat innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes.



4.7.8 Gang der Normalstation

Die isolierte Anzahl koloniebildender Einheiten auf dem Gang der Normalstation reichte von 2,2 KBE/m³ bis zu 9,4 KBE/m³. Die niedrigste Anzahl wurde im Juni 2008, die höchste Anzahl im August 2008 isoliert.

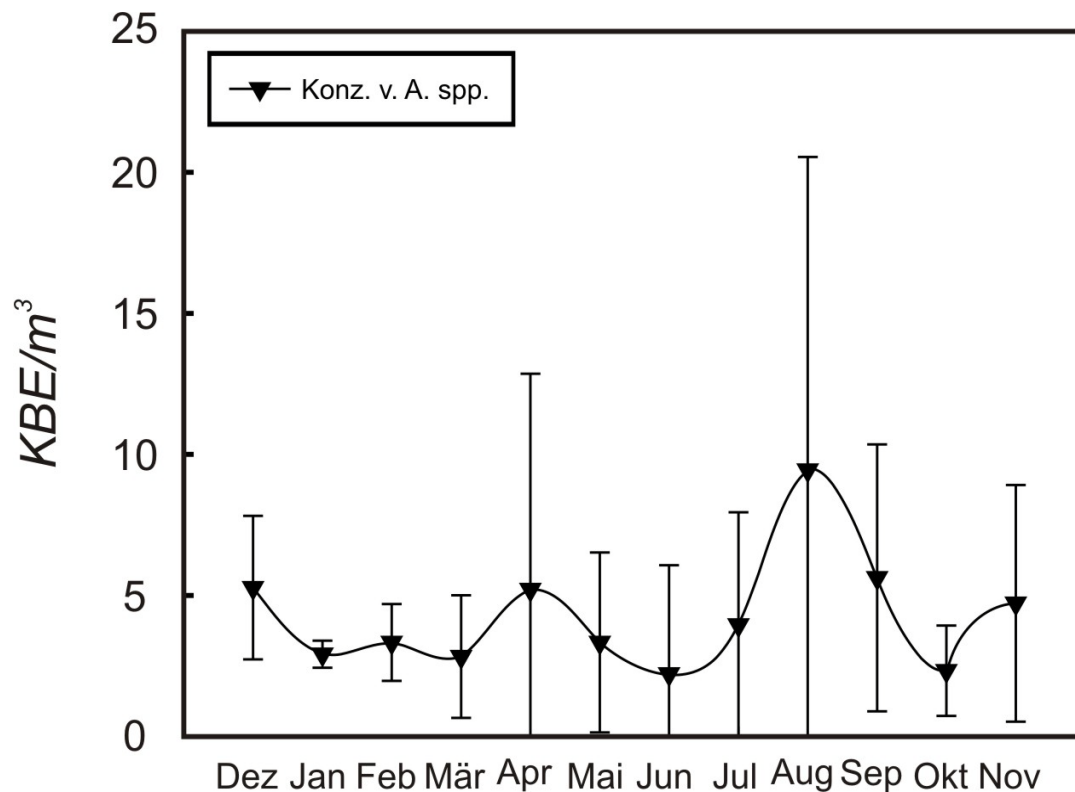
Tabelle 23: Durchschnittliche Anzahl KBE/m³ je Monat in der Umgebungsluft auf dem Gang der Normalstation sowie Standardabweichung.

Monat	Anzahl der durchschnittlichen KBE je Monat	Standardabweichung
Dezember 07	5,3	2,5
Januar 08	2,9	0,5
Februar 08	3,3	1,4
März 08	2,8	2,2
April 08	5,2	7,6
Mai 08	3,3	3,2
Juni 08	2,2	3,8
Juli 08	4	4,0
August 08	9,4	11,1
September 08	5,6	4,7
Oktober 08	2,3	1,6
November 08	4,7	4,2

In den Wintermonaten lag die durchschnittliche KBE-Zahl bei 3,8 KBE/m³. Im Frühjahr konnten im Mittel 3,8 KBE/m³ und im Sommer 5,2 KBE/m³ isoliert werden. Im Herbst lag die durchschnittliche KBE-Zahl bei 4,2 KBE/m³.

Aus den Ergebnissen der Beobachtungsperiode konnte eine durchschnittliche KBE-Zahl von 4,3 KBE/m³ je Monat errechnet werden.

Abbildung 26: Mittlere Konzentration von *Aspergillus* spp. je Monat auf dem Gang der Normalstation der Ebene 13 des Bettenhauses der Uniklinik Köln innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes.



4.7.9 Vergleich der KBE/m³ auf dem Gang und vor den Aufzügen

Ein Vergleich (**Abbildung 27**) der Ergebnisse der Messpunkte vor den Aufzügen (**Abbildung 22**) mit jenen auf dem Gang der Normalstation (**Abbildung 26**) zeigt, dass zu Beginn der Untersuchungen im Dezember 2007 die im Mittel isolierte Anzahl KBE/m³ in beiden Bereichen annähernd gleich war.

Im Januar, Februar und März 2008 entfernen sich die beiden Kurven voneinander. Im Bereich der Aufzüge wurden je Monat ca. 2 bis 3 KBE/m³ mehr isoliert.

Im April schließlich näherten sich die Werte wieder.

Bis einschließlich Juli 2008 wurden je Monat wieder annähernd gleiche Zahlen für die KBE/m³ im Bereich der Aufzüge und des Ganges ermittelt.

Im August übersteigt die Anzahl der KBE/m³ auf dem Gang der „offenen“ Normalstation erstmals jene, welche für den Bereich der Aufzüge ermittelt werden

konnte. In diesem Monat wurden auf dem Gang im Mittel 1,6 KBE/m³ mehr isoliert als im Aufzugsbereich.

Im September, Oktober und November 2008, folglich im Herbst 2008, nahm die auf dem Gang isolierte Anzahl der KBE/m³ wieder deutlich ab. Es wurden im Bereich der Aufzüge 12,1 KBE/m³ isoliert, auf dem Gang hingegen mit 4,2 KBE/m³ insgesamt 7,9 KBE/m³ weniger.

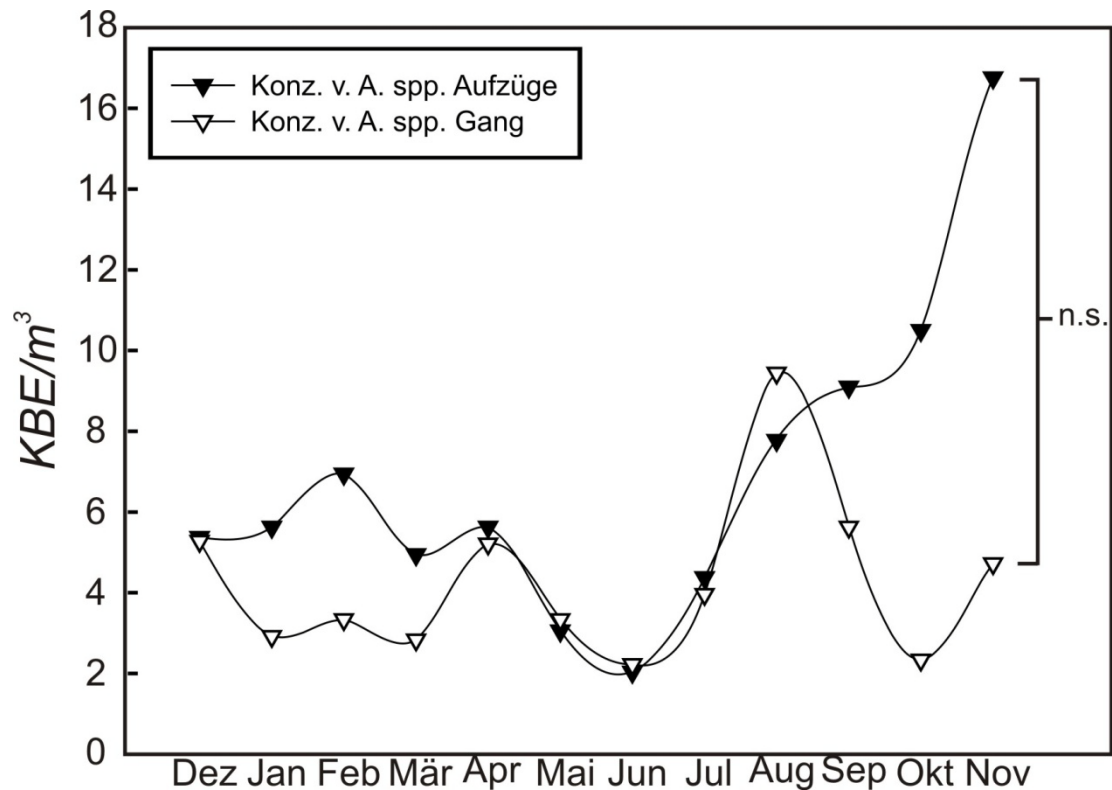
Die Berechnung der durchschnittlich je Monat isolierten KBE-Zahl ergab für den Bereich der Aufzüge wie bereits beschrieben einen Wert von 6,8 KBE/m³ und für den Gang 4,3 KBE/m³.

Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 24: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl KBE/m³ je Monat in der Umgebungsluft der Aufzüge (insgesamt) und des Gangs der Normalstation.

Monat	durchschnittlichen KBE Aufzüge insgesamt	durchschnittlichen KBE Gang
Dezember 07	5,4	5,3
Januar 08	5,6	2,9
Februar 08	6,9	3,3
März 08	4,9	2,8
April 08	5,6	5,2
Mai 08	3,1	3,3
Juni 08	2,0	2,2
Juli 08	4,4	4
August 08	7,8	9,4
September 08	9,1	5,6
Oktober 08	10,5	2,3
November 08	16,8	4,7

Abbildung 27: Vergleich der mittleren Konzentrationen von *Aspergillus* spp. vor den Aufzügen mit den Ergebnissen für den Gang der Normalstation je Monat innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes.



4.8 Konzentration von *Aspergillus* spp. im Foyer der Uniklinik Köln während der 12-monatigen Beobachtungsperiode

Das Foyer, welches im Grunde zum Innenbereich der Uniklinik zählt, wird gesondert aufgeführt, da dort im Vergleich zur Station andere Gegebenheiten herrschen. Viele Menschen passieren diesen Abschnitt täglich, es gibt einen direkten Zugang zur Frischluft, Pflanzbeete mit Pflanzen und Lehm Boden in diesem Bereich sowie eine Bewässerung und direkte Sonneneinstrahlung, welche durch ein Glasdach gewährleistet wird.

Die Konzentration von *Aspergillus* spp. in diesem besonderen Bereich reichte für den Beobachtungszeitraum von 0,8 KBE/m³ pro Monat bis hin zu 28,3 KBE/m³ pro Monat.

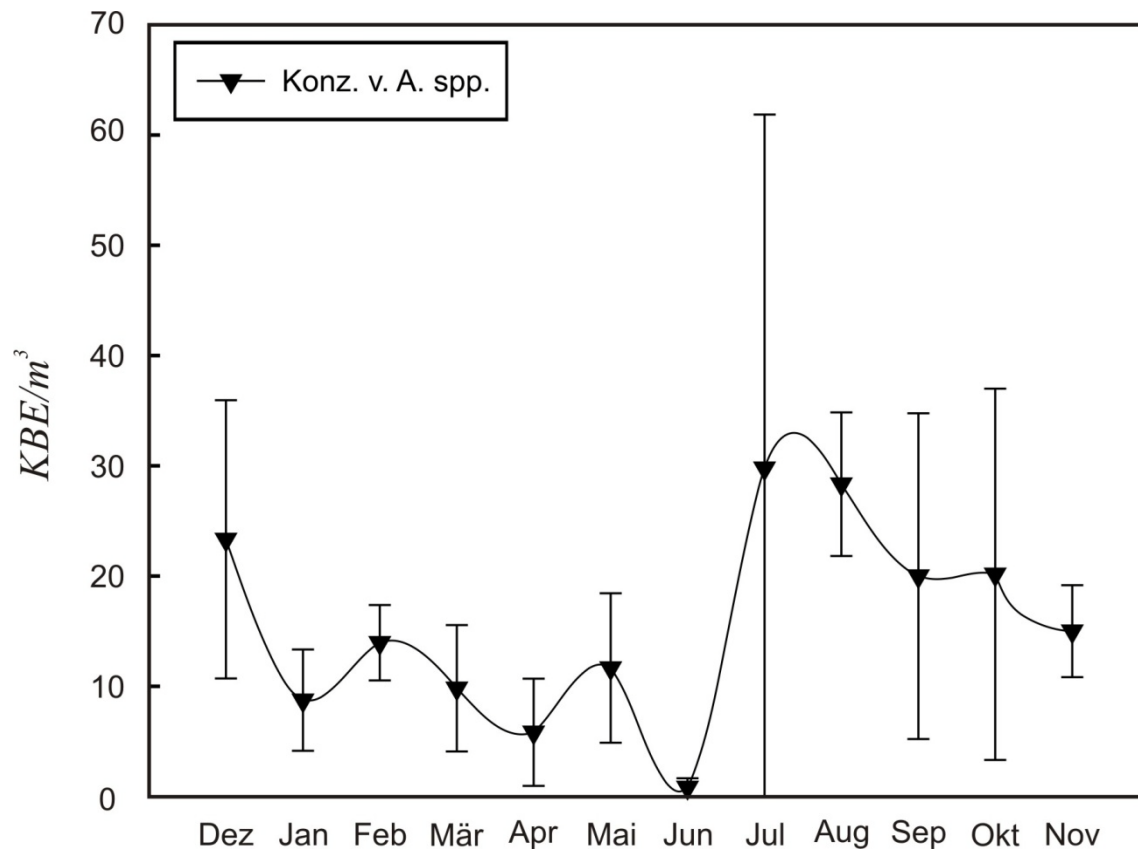
Tabelle 25: Durchschnittliche Anzahl KBE/m³ je Monat im Foyer sowie Standardabweichung.

Monat	Anzahl der durchschnittlichen KBE je Monat	Standardabweichung
Dezember 07	35,8	12,6
Januar 08	13,78	4,6
Februar 08	19,4	3,4
März 08	9,8	5,7
April 08	6,7	4,9
Mai 08	14,8	6,8
Juni 08	23,3	0,8
Juli 08	35,4	32,1
August 08	33,5	6,5
September 08	30,4	14,8
Oktober 08	25,8	16,8
November 08	19,2	4,2

Der Kurvenverlauf lässt hier erkennen, dass die Anzahl der KBE/m³ pro Monat von Dezember bis Juni abnahm. Dies entspricht einer Abnahme der KBE/m³ pro Monat für die Winter- und Frühjahrsmonate. Der Tiefpunkt wurde im Juni mit 0,8 KBE/m³ erreicht. Im Juli und im August wurde eine rapide Zunahme der KBE/m³ beobachtet. Der Höhepunkt der Anzahl der KBE/m³ wurde im August mit 28,3 KBE/m³ erreicht. Für die Monate September, Oktober und November wurde ein Rückgang der Anzahl der KBE/m³ je Monat verzeichnet. Im November schließlich wurde der Wert 15,0 KBE/m³ erreicht, nachdem die Werte im September und Oktober bei ca. 20,0 KBE/m³/Monat lagen.

Für den genannten Beobachtungszeitraum wurde im Mittel für *Aspergillus* spp im Foyer der Uniklinik Köln eine Konzentration von 14,9 KBE/m³ je Monat errechnet.

Abbildung 28: Mittlere Konzentration von *Aspergillus* spp. je Monat im Foyer der Uniklinik Köln innerhalb des 12-monatigen Beobachtungszeitraumes.



4.9 Patientenkollektiv und Gesamtzahl der gewonnenen Nasenabstriche während der 12-monatigen Beobachtungsperiode

Insgesamt nahmen 240 Patienten an der Untersuchung teil. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Untersuchung 19 Jahre alt, der älteste Patient hatte ein Alter von 85 Jahren erreicht. Der Medianwert für das Alter der Patienten betrug 55 Jahre. Unter den 240 Patienten befanden sich 107 Frauen und 133 Männer.

Eine Gesamtzahl von 855 Nasenabstrichen wurde unter diesen Patienten gewonnen. Von diesen Abstrichen war nur ein einziger positiv: für *Aspergillus niger*.

Der positive Abstrich stammte von einem männlichen, 57 Jahre alten Patienten, welcher an einem Non-Hodgkin-Lymphom litt. Bei dem Patienten wurden insgesamt 5 Nasenabstriche durchgeführt, vier davon in Folge im Dezember 2007. Diese 4 ersten Abstriche zeigten in der Kultur kein Wachstum von *Aspergillus* spp. Der fünfte Abstrich wurde im Januar gemacht, als der Patient nach seiner Beurlaubung über die

Weihnachtstage und Silvester wieder stationär aufgenommen wurde. Dieser fünfte Abstrich zeigte sich in der Kultur positiv für das Wachstum von *Aspergillus niger*.

4.10 Anzahl der Patienten, welche im Studienzeitraum an einer invasiven Aspergillose erkrankten

Während des Beobachtungszeitraums von Dezember 2007 bis November 2008 erkrankten insgesamt 27 Patienten an einer invasiven Aspergillose.

Bei 12 der insgesamt 27 erkrankten Patienten hatten wir die Gelegenheit mittels Nasenabstrich die Kolonisierung des oberen Respirationstraktes mit *Aspergillus* spp. zu überprüfen. Keiner der insgesamt 12 untersuchten Patienten wies im Beobachtungszeitraum einen *Aspergillus* spp. positiven Nasenabstrich auf.

Der einzige positiv getestete Patient entwickelte innerhalb der Beobachtungsperiode keine invasive Aspergillose.

4.11 Meteorologische Parameter innerhalb des Studienzeitraumes und Ihre Zuordnung zu den Jahreszeiten

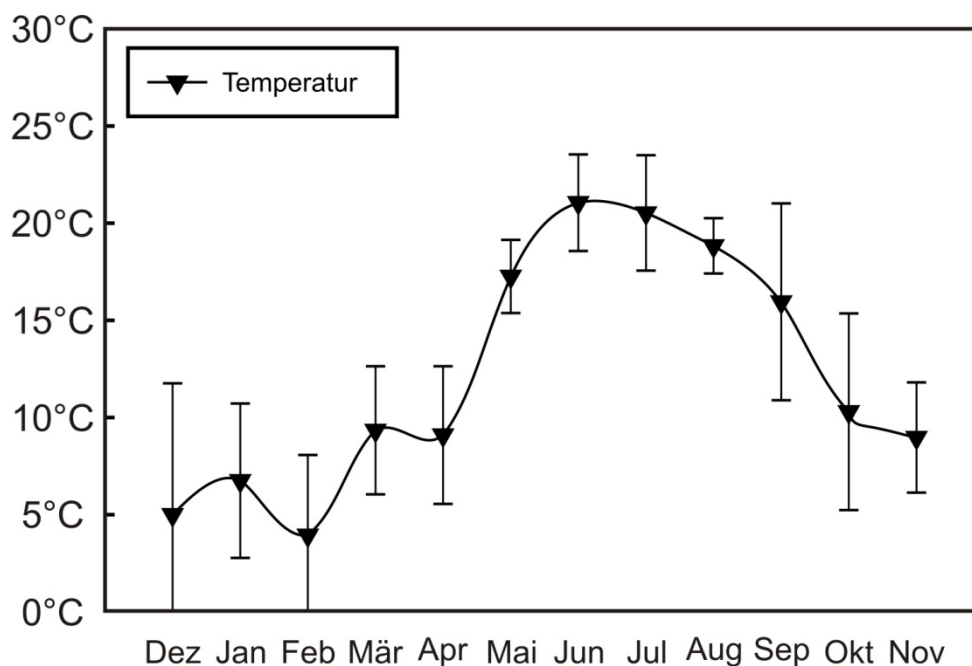
4.11.1 Temperatur

Für die Temperatur wurden für alle Monate Mittelwerte errechnet. Diese zeigten, dass im Februar die niedrigste Temperatur mit einem Wert von 4,0°C vorherrschte und der Höchstwert 21,1°C im Juni betrug. Die übrigen Daten sind der Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 26: Durchschnittliche Temperatur in °C je Monat.

Monat	Durchschnittliche Temperatur in °C je Monat
Dezember 07	5,0
Januar 08	6,8
Februar 08	4,0
März 08	9,3
April 08	9,1
Mai 08	17,3
Juni 08	21,1
Juli 08	20,5
August 08	18,8
September 08	16,0
Oktober 08	10,3
November 08	9,0

Zu Beginn der Beobachtungen im Dezember 2007 wurde ein mittlerer Temperaturwert von 5,0°C errechnet. Im Januar des Jahres 2008 betrug die mittlere Temperatur 6,8°C. Im Februar wurden wie bereits erwähnt die niedrigsten Temperaturen des Beobachtungsjahres gemessen. Im März, April und Mai lagen die durchschnittlichen Temperaturen zwischen 9,1 und 17,3°C. Im Juni wurde der Höchstwert erreicht. Die mittleren Temperaturen der darauf folgenden Monate Juli bis einschließlich November sanken im Verlauf. Im Juli betrug die Temperatur noch 20,5°C und erreichte schließlich im November einen Wert von 9,0°C im Mittel.

Abbildung 29: Mittlere Temperatur in °C je Monat innerhalb des Beobachtungszeitraumes.

4.11.2 Relative Luftfeuchtigkeit

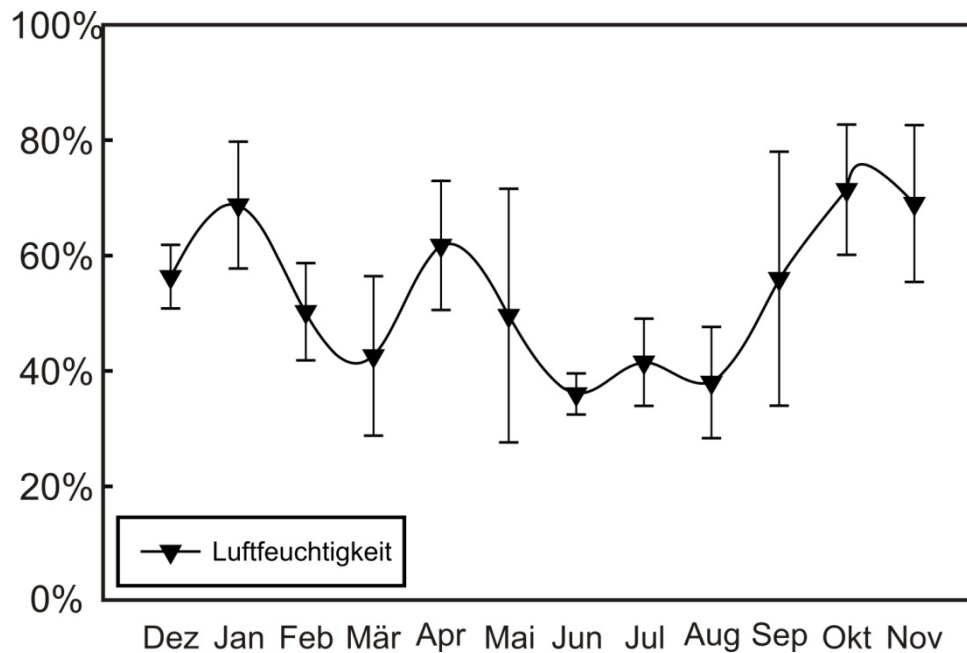
Auch für die relative Luftfeuchtigkeit wurden Mittelwerte für die 12 Monate errechnet. Die mittleren Werte für die Luftfeuchtigkeit befanden sich zwischen einem Minimalwert von 36% im Monat Juni und einem Maximalwert von 71,4% im Oktober.

Tabelle 27: Durchschnittliche rel. Luftfeuchtigkeit in % je Monat.

Monat	Durchschnittliche rel. Luftfeuchtigkeit in % je Monat
Dezember 07	56,3
Januar 08	68,8
Februar 08	50,3
März 08	42,6
April 08	61,8
Mai 08	49,6
Juni 08	36,0
Juli 08	41,5
August 08	38,0
September 08	56,0
Oktober 08	71,4
November 08	69,0

Die mittlere Luftfeuchtigkeit des Frühlings lag bei insgesamt 51,3%. Die mittlere Luftfeuchtigkeit für den Sommer lag bei 38,5%. Für den Herbst ergab sich ein Wert von 65,5% und für den Winter ein Wert von 58,4%. Damit waren Herbst und Winter die Jahreszeiten, in welchen während des Beobachtungszeitraumes im Mittel die höchsten Werte für die Luftfeuchtigkeit erzielt wurden. Aus einem Vergleich mit dem Winter ergab sich für den Frühling ein nur gering gradig erniedrigter Wert für die Luftfeuchtigkeit. Im Sommer zeigte sich eine Minderung der Luftfeuchtigkeit von mehr als 20%, nachzuvollziehen durch die höheren Temperaturen während der Sommermonate.

Abbildung 30: Mittlere relative Luftfeuchtigkeit in % je Monat innerhalb des Beobachtungszeitraumes.



4.11.3 Taupunkt

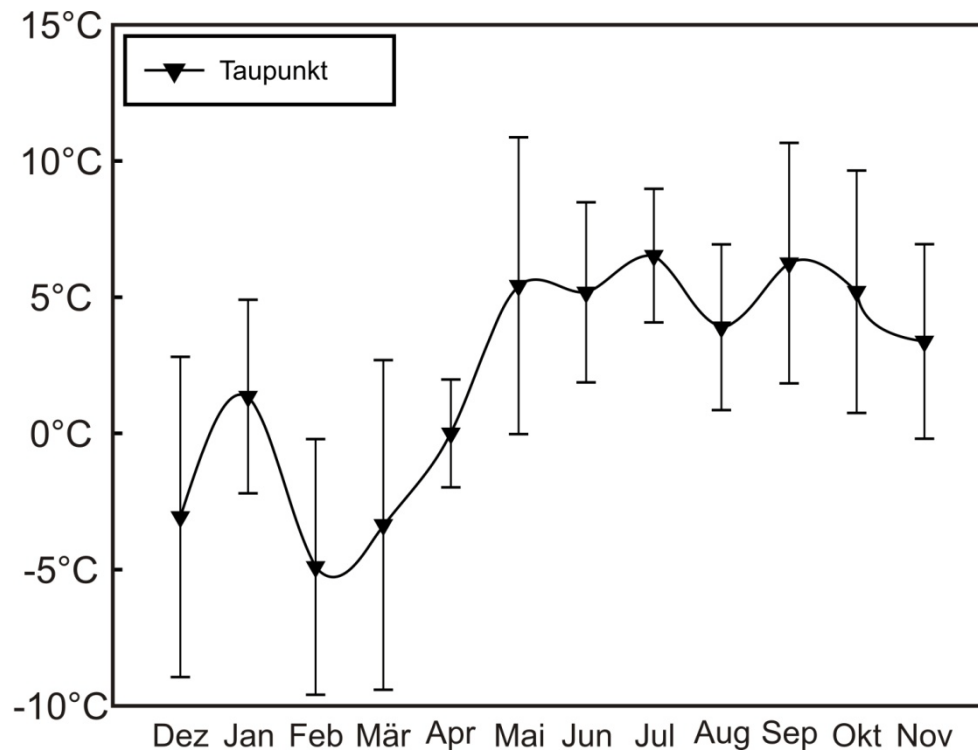
Der niedrigste Mittelwert für den Taupunkt wurde mit $-4,9^{\circ}\text{C}$ im Februar und der höchste mittlere Wert mit $6,5^{\circ}\text{C}$ im Juli ermittelt.

Tabelle 28: Durchschnittlicher Taupunkt in $^{\circ}\text{C}$ je Monat.

Monat	Durchschnittlicher Taupunkt in $^{\circ}\text{C}$ je Monat
Dezember 07	-3,1
Januar 08	1,4
Februar 08	-4,9
März 08	-3,4
April 08	0,0
Mai 08	5,4
Juni 08	5,2
Juli 08	6,5
August 08	3,9
September 08	6,3
Oktober 08	5,2
November 08	3,4

Im Winter und im Frühling waren die mittleren Taupunkttemperaturen der jeweiligen Monate (der Mai ausgenommen) deutlich niedriger, als die mittleren Taupunkte der Sommer- und Herbstmonate. „Niedrig“ grenzte hier einen Bereich zwischen $-4,9^{\circ}\text{C}$ und $1,4^{\circ}\text{C}$ ein. Im Sommer und Herbst lagen die Werte zwischen $3,4^{\circ}\text{C}$ und $6,5^{\circ}\text{C}$.

Abbildung 31: Mittlere Taupunkttemperatur in °C je Monat innerhalb des Beobachtungszeitraumes.



4.11.4 Windgeschwindigkeit

Die niedrigste mittlere Windgeschwindigkeit wurde für November errechnet. Sie betrug 1,9 km/h. Die höchste Windgeschwindigkeit lag im August mit 9,2 km/h vor.

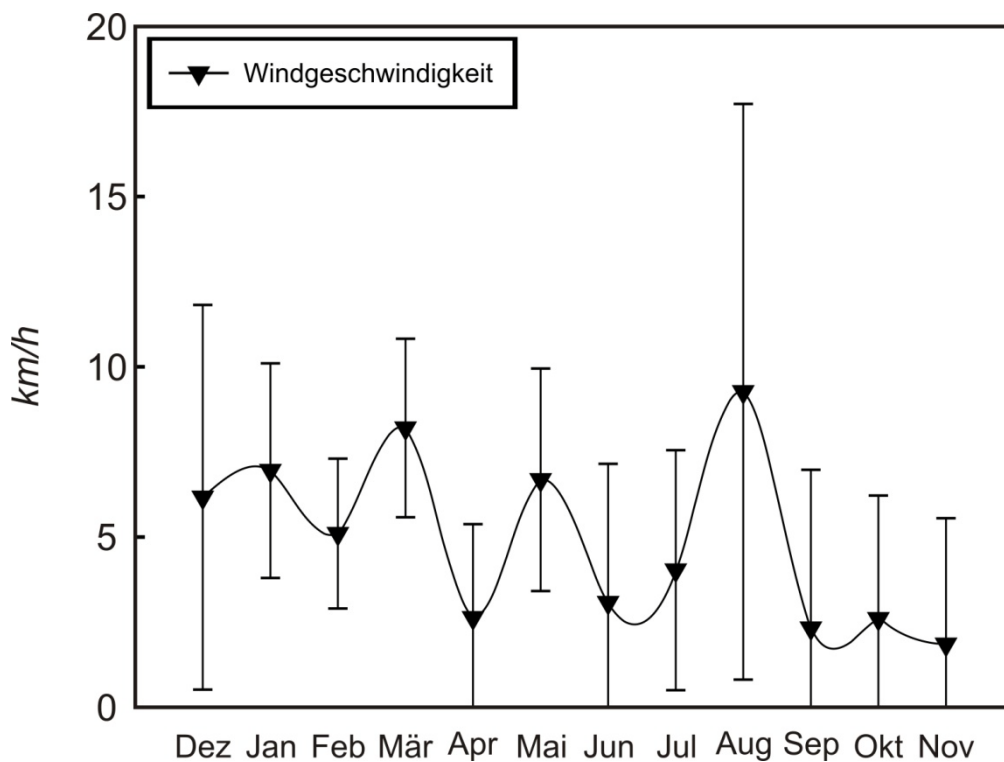
Tabelle 29: Durchschnittliche Windgeschwindigkeit in km/h je Monat.

Monat	Durchschnittliche Windgeschwindigkeit in km/h je Monat
Dezember 07	6,2
Januar 08	7,0
Februar 08	5,1
März 08	8,2
April 08	2,6
Mai 08	6,7
Juni 08	3,1
Juli 08	4,0
August 08	9,3
September 08	2,3
Oktober 08	2,6
November 08	1,9

Aus den erhobenen Einzelwerten an den jeweiligen Messtagen ergaben sich für die Jahreszeiten folgende Mittelwerte: Winter: 6,1 km/h; Frühling: 5,8 km/h; Sommer: 5,5 km/h und Herbst: 2,3 km/h.

Die Winter- und Frühlingsmonate (Monat April ausgenommen) wiesen im Mittel höhere Windgeschwindigkeiten auf, als die Sommer- und Herbstmonate. Im Mittel lagen sie etwa 4,0 km/h. Von dieser Regel muss von den Sommermonaten jedoch der August ausgeschlossen werden, da dieser eine überdurchschnittlich hohe Windgeschwindigkeit zeigte.

Abbildung 32: Mittlere Windgeschwindigkeit in km/h je Monat innerhalb des Beobachtungszeitraumes.



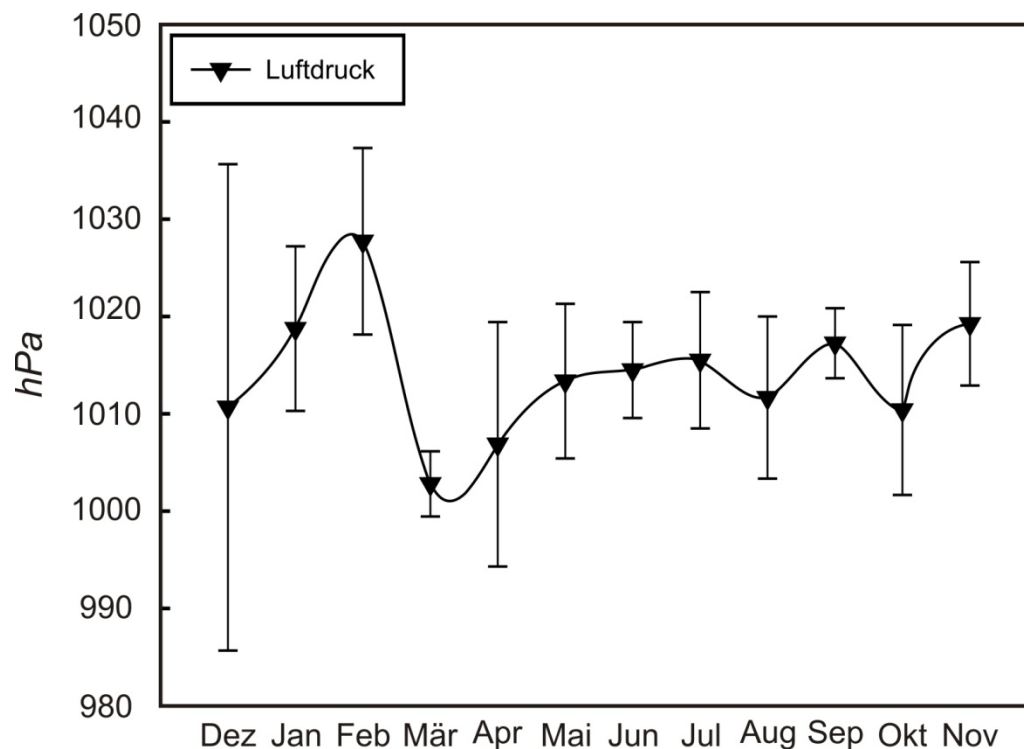
4.11.5 Luftdruck

Der niedrigste mittlere Luftdruck maß 1002,8 hPa im März. Zuvor wurde im Februar der höchste mittlere Luftdruck mit 1027,7 hPa ermittelt. Im April bis einschließlich November 2008 wurden Mittelwerte in einem Bereich von 1006,9 hPa bis 1019,3 hPa errechnet.

Tabelle 30: Durchschnittlicher Luftdruck in hPa je Monat.

Monat	Durchschnittlicher Luftdruck in hPa je Monat
Dezember 07	1010,7
Januar 08	1018,8
Februar 08	1027,7
März 08	1002,8
April 08	1006,9
Mai 08	1013,4
Juni 08	1012,7
Juli 08	1015,5
August 08	1011,7
September 08	1017,3
Oktober 08	1010,4
November 08	1019,3

Eine Berechnung der Mittelwerte für die 4 Jahreszeiten zeigte den Winter mit einem mittleren Luftdruck von 1019,1 hPa an oberster Stelle, den Herbst mit 1015,6 hPa an zweiter Position, den Sommer mit 1013,3 hPa an dritter Stelle und schließlich den Frühling mit 1007,7 hPa an unterster Position.

Abbildung 33: Mittlerer Luftdruck in hPa je Monat innerhalb des Beobachtungszeitraumes.

4.11.6 Vergleich der meteorologischen Daten mit den Werten der mittleren Konzentration in KBE/m³ für *Aspergillus* spp. im Außen- und Innenbereich

Für jeden meteorologischen Parameter wurde der Übersichtlichkeit halber eine eigene Abbildung für den Vergleich erstellt. Die grüne Linie spiegelt jeweils die Dichte der Aspergillen in der Außenluft wider, die rote Linie zeigt die Dichte von *Aspergillus* spp. auf der hämatookologischen Station.

Abbildung 34: Vergleich der mittleren Temperatur in °C mit den Mittelwerten für die Konzentration gemessen in KBE/m³ der *Aspergillus* spp. im Außen- und Innenbereich innerhalb des Beobachtungszeitraumes.

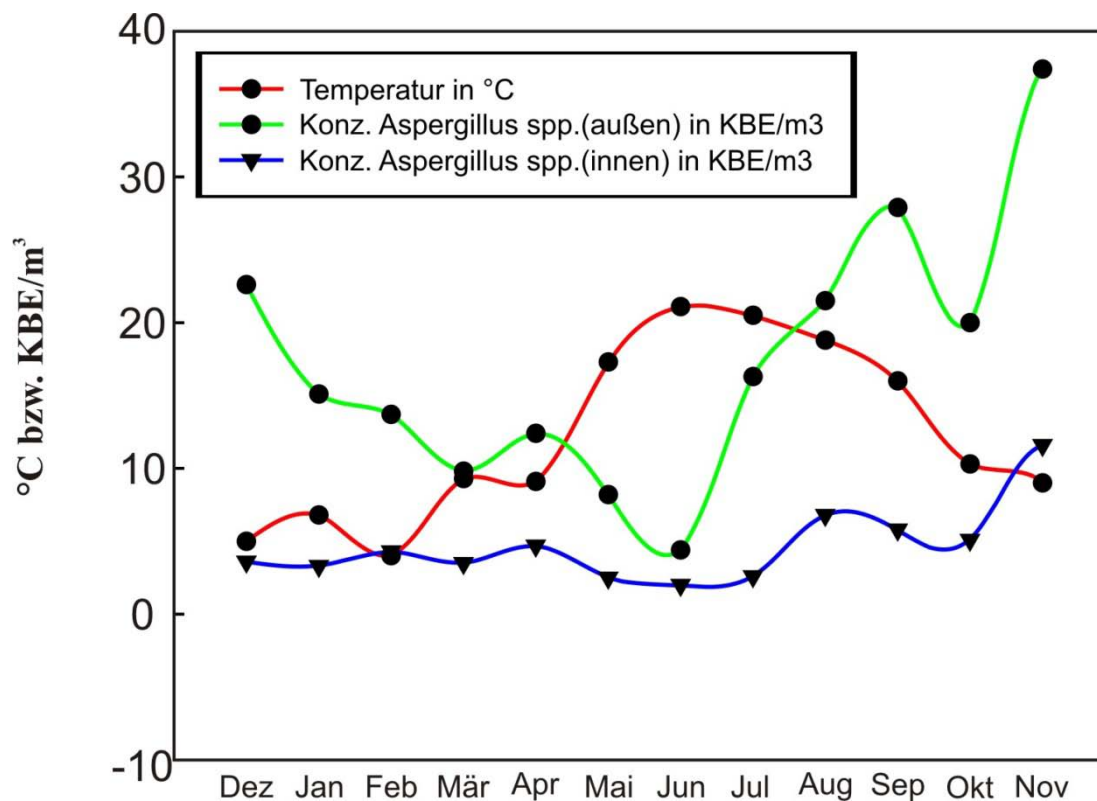


Abbildung 35: Vergleich der mittleren Luftfeuchtigkeit in % mit den Mittelwerten für die Konzentration gemessen in KBE/m³ der *Aspergillus* spp. im Außen- und Innenbereich innerhalb des Beobachtungszeitraumes.

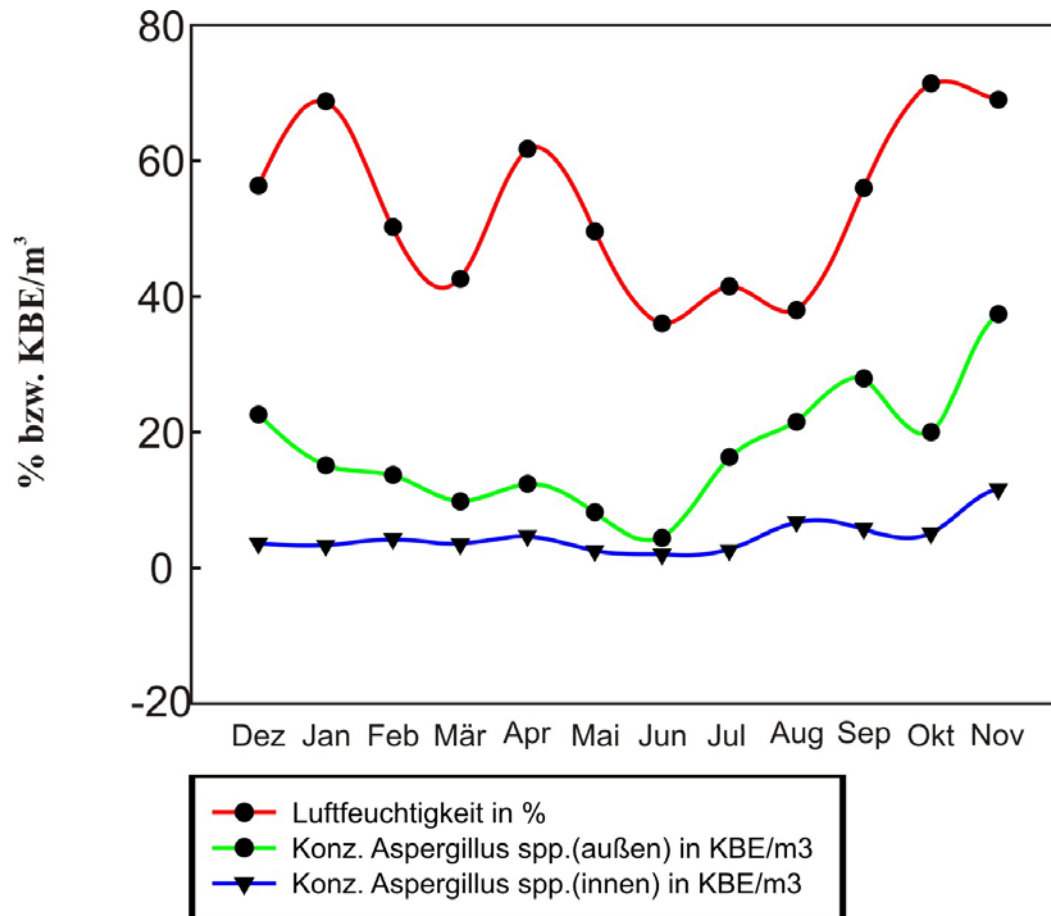


Abbildung 36: Vergleich der mittleren Taupunkttemperatur in °C mit den Mittelwerten für die Konzentration gemessen in KBE/m³ der *Aspergillus* spp. im Außen- und Innenbereich innerhalb des Beobachtungszeitraumes.

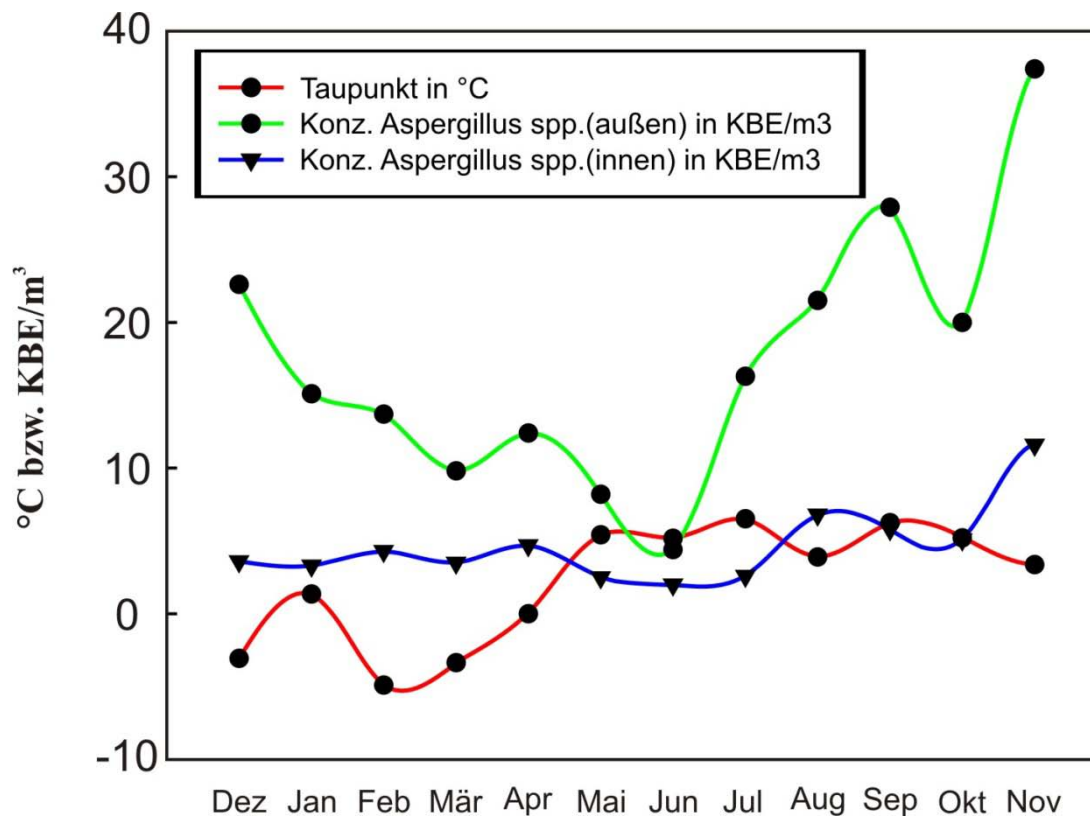


Abbildung 37: Vergleich der mittleren Windgeschwindigkeit in km/h mit den Mittelwerten für die Konzentration gemessen in KBE/m³ der *Aspergillus* spp. im Außen- und Innenbereich innerhalb des Beobachtungszeitraumes.

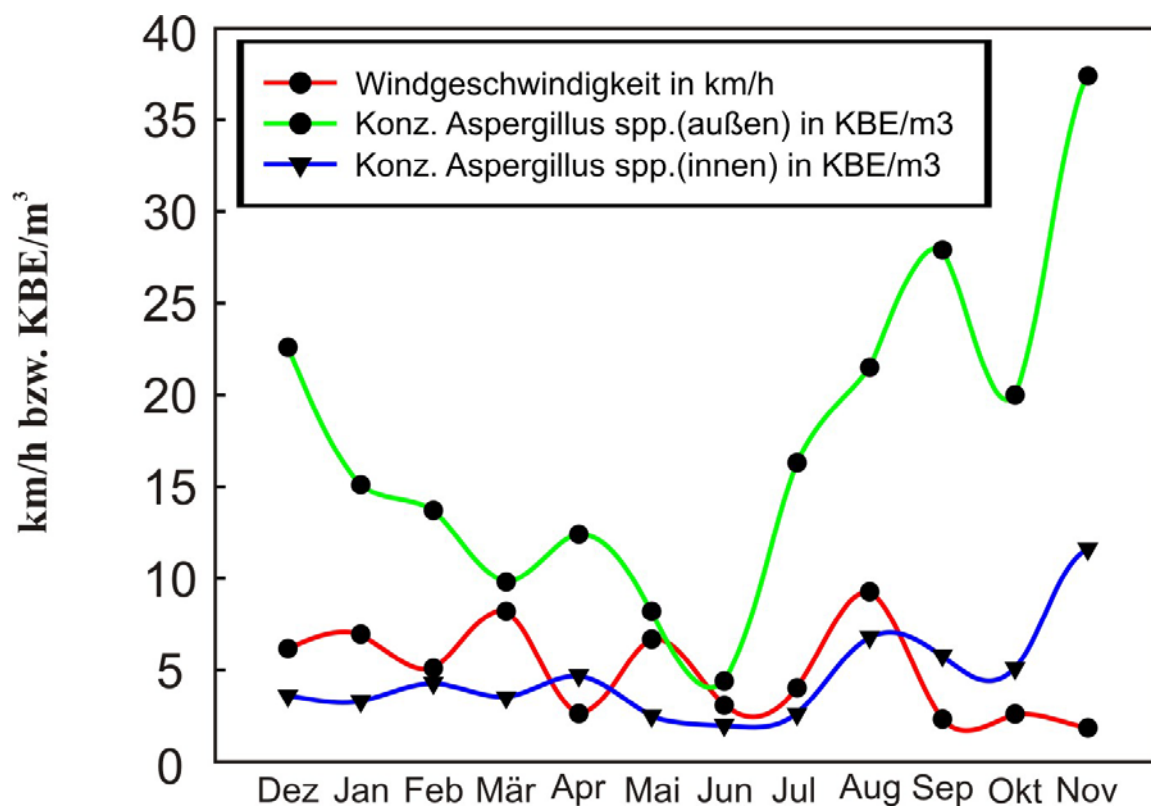
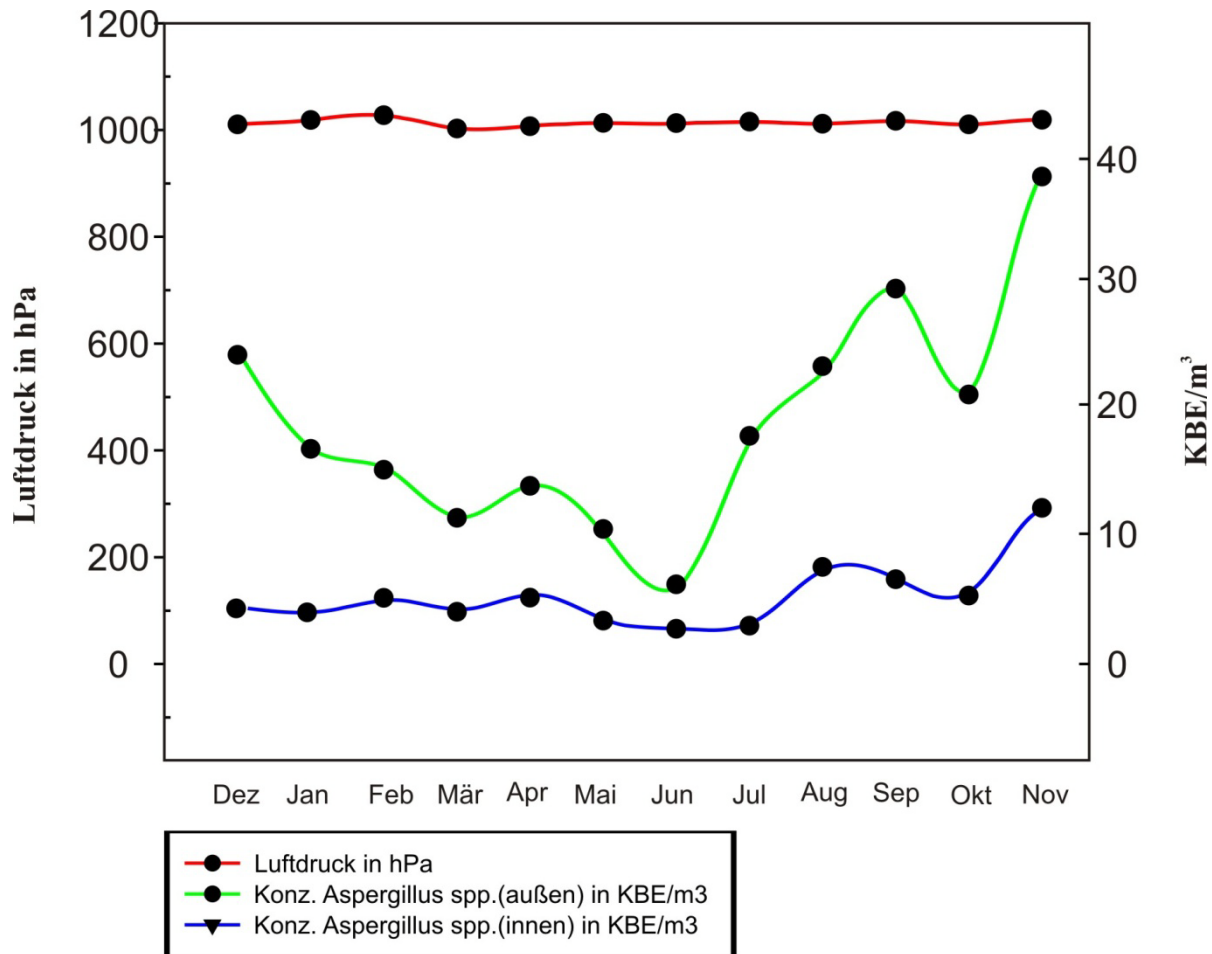


Abbildung 38: Vergleich des mittleren Luftdrucks in hPa mit den Mittelwerten für die Konzentration gemessen in KBE/m³ der *Aspergillus* spp. im Außen- und Innenbereich innerhalb des Beobachtungszeitraumes.



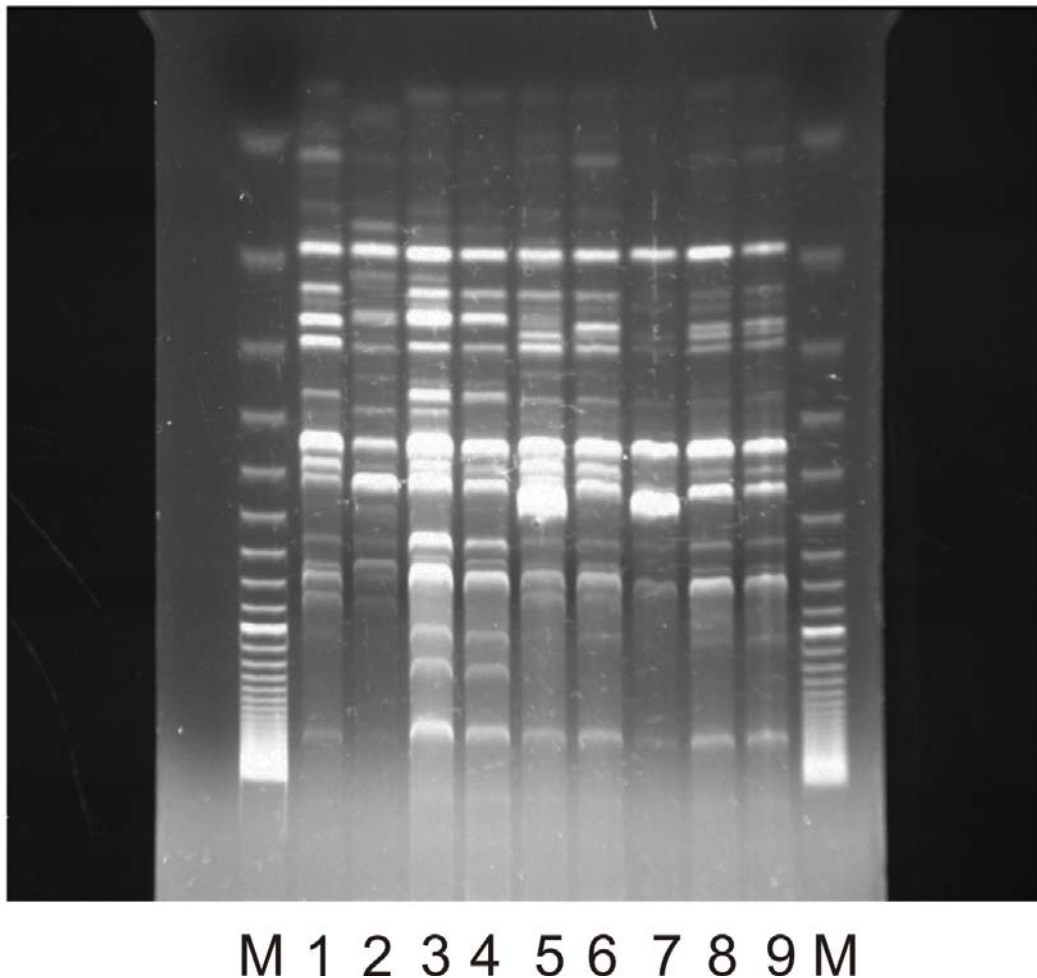
Die Konzentration der in der Außenluft registrierten *Aspergillus*sporen wurde mittels einer multiplen linearen Regressionsanalyse, welche die Variablen Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit, Taupunkt, Windgeschwindigkeit, Luftdruck und Jahreszeit (Frühling, Sommer, Herbst und Winter) beinhaltete, analysiert. Abgesehen der beiden Variablen relative Luftfeuchtigkeit und Jahreszeit, zeigte keine der anderen Variablen eine Korrelation mit den gemessenen Konzentrationen für *Aspergillus* spp. im Außenbereich ($p=0,001$, $r^2=0,309$). Auf den Frühling bezogen zeigten die 3 anderen Jahreszeiten entsprechende Unterschiede (z. B. bezgl. des Regressionskoeffizienten); Sommer: 15,2, 95%-Konfidenzintervall 6,6-23,7, $p=0,001$; Herbst: 10,6, 0,8-20,4, $p=0,035$; Winter: 1,4-7,5 bis zu 10,3, $p=0,756$ und schließlich die relative Luftfeuchtigkeit: 0,23, 0,01-0,46, $p=0,045$.

4.12 Verwandtschaftsgrade der mittels Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis untersuchten *A. terreus*-Stämme

4.12.1 Primer C II

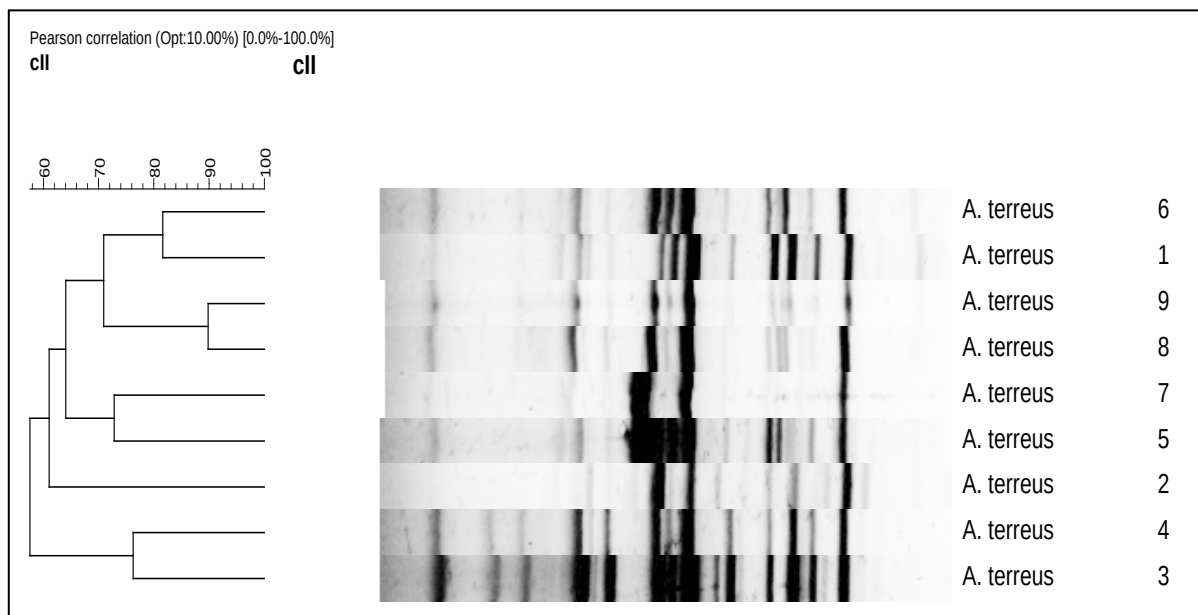
Die folgende Fotografie zeigt das fertige Agarosegel nach Abschluss der Elektrophorese. Es wurde unter UV-Licht fotografiert.

Abbildung 39: Agarosegelelektrophorese, Primer C II. In der Spur, welche durch den Großbuchstaben M gekennzeichnet ist lief der Marker, in den mit 1 bis 9 bezeichneten Spuren die PCR-Produkte der jeweiligen *A. terreus*-Isolate.



Mit Hilfe des Programms BioNumerics von Applied Maths, Belgien, wurde im Anschluss folgendes Dendrogramm erstellt.

Abbildung 40: Dendrogramm, Primer C II.



Mit Hilfe des Dendrogrammes ließ sich der Verwandtschaftsgrad der 9 isolierten *A. terreus*-Stämme bestimmen. Stämme mit einem hohen Grad der Verwandtschaft wurden letztlich durch eine 90%ige Homologie in ihrem Bandenmuster definiert.

Unter Verwendung des Primers C II zeigten Stamm 8 und 9 eine 90%ige Homologie in ihrem Bandenmuster und besaßen somit einen hohen Grad der Verwandtschaft. Die übrigen 7 Stämme zeigten ebenfalls sich ähnelnde Bandenmuster. Eine 90%ige Homologie konnte jedoch nicht für diese Stämme gesehen werden.

Stamm 1 und 6 wiesen eine ca. 82%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 7 und 5 wiesen eine ca. 73%ige Homologie in ihrem Bandenmuster auf.

Stamm 3 und 4 waren zu ca. 67% identisch. Stamm 3 und 4 wiesen zu den übrigen Stämmen eine ca. 58%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 2 zeigte eine 61%ige genetische Übereinstimmung zu den Stämmen 5, 7, 8, 9, 1 und 6.

Das Bandenmuster der Stämme 7 und 5 wies eine ca. 64%ige Übereinstimmung mit den Stämmen 8, 9, 1 und 6 auf.

Stamm 8 und 9 zeigten mit den Stämmen 6 und 1 ein ca. 71%iges homologes Bandenmuster.

4.12.2 Primer R 108

Die folgende Fotografie zeigt das fertige Agarosegel nach Abschluss der Elektrophorese. Es wurde unter UV-Licht fotografiert.

Abbildung 41: Agarosegelelektrophorese, Primer R 108. In der Spur, welche durch den Großbuchstaben M gekennzeichnet ist lief der Marker, in den mit 1 bis 9 bezeichneten Spuren die PCR-Produkte der jeweiligen *A. terreus*-Isolate.

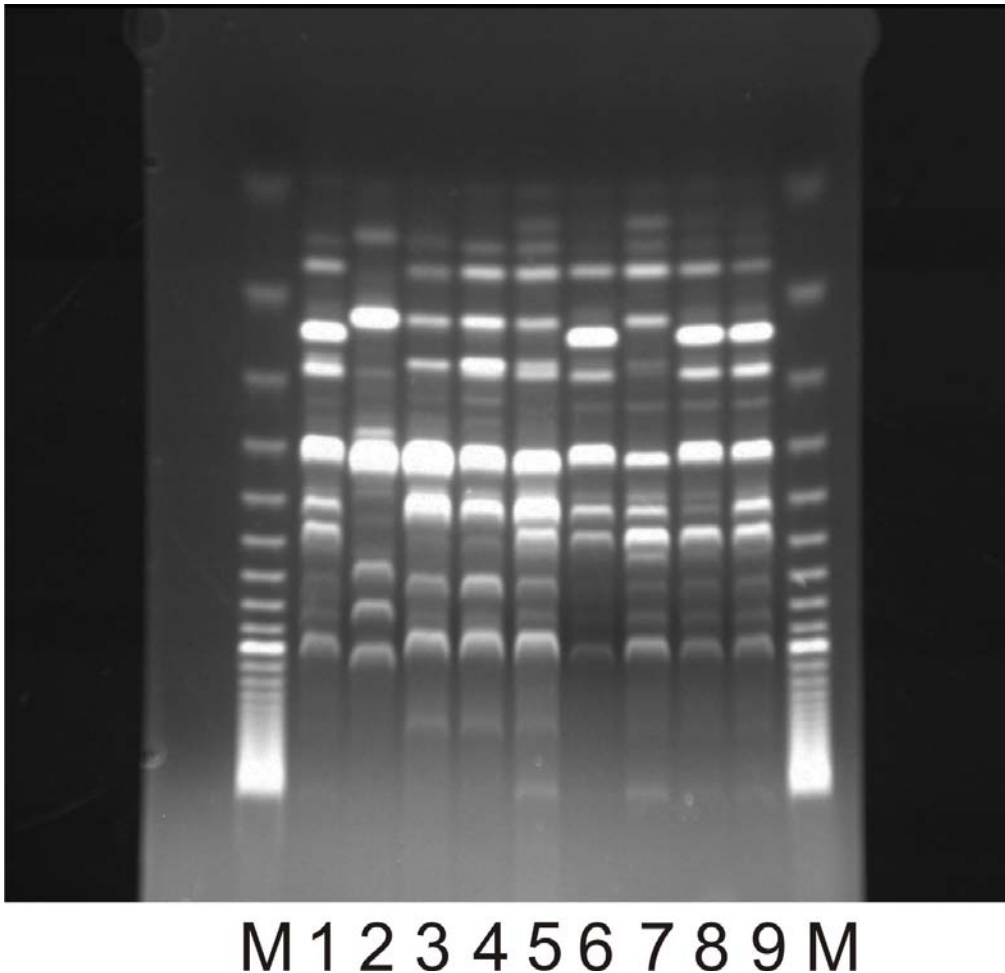
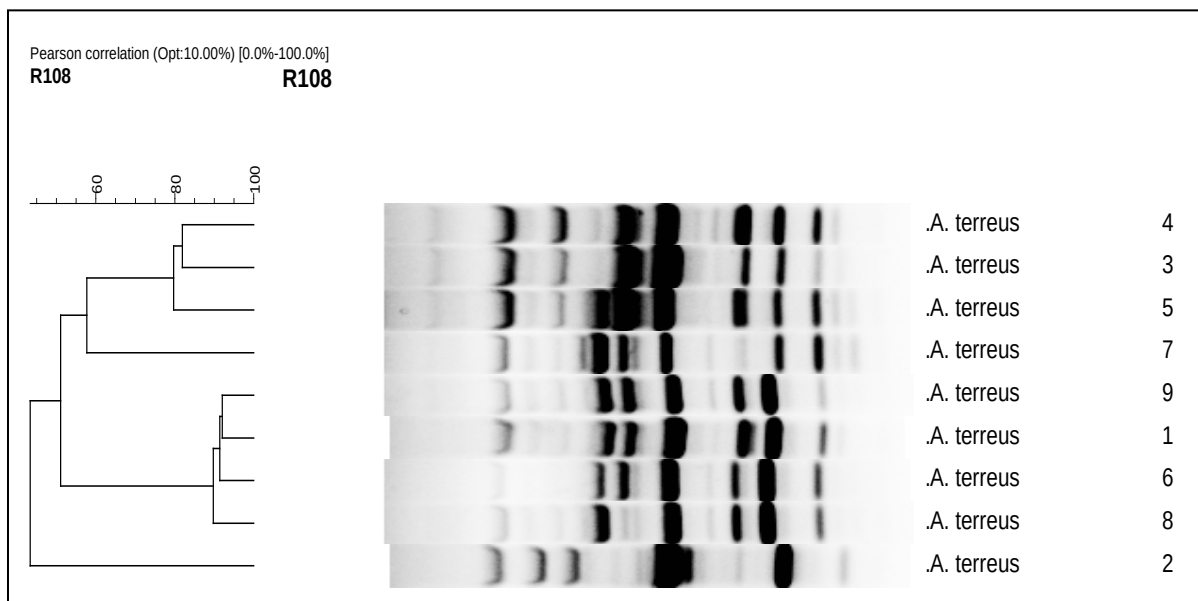


Abbildung 42: Dendrogramm, Primer R 108.

Primer R 108 ergab folgende Verwandtschaftsgrade:

Stamm 9 und 1 wiesen eine ca. 92%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 9 und 1 wiesen zu Stamm 6 eine ca. 91%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 8 wies mit den Stämmen 9, 1 und 6 ein ca. 90%iges homologes Bandenmuster auf. Dies bedeutete für die Stämme 1, 6, 8 und 9 zu einem hohen Grad untereinander genetisch verwandt zu sein.

Für die anderen *A. terreus*-Stämme ergaben sich die folgenden prozentualen Werte für die Übereinstimmung der Bandenmuster:

Stamm 4 und 3 wiesen eine ca. 81%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 5 stimmte mit den Stämmen 4 und 3 zu ca. 79% überein.

Stamm 7 wies zu den Stämmen 5, 3 und 4 eine ca. 58%ige Homologie des Bandenmusters auf.

Die Stämme 9, 1, 6 und 8 wiesen zu den Stämmen 4, 3, 5 und 7 eine ca. 56%ige genetische Übereinstimmung auf.

Das Bandenmuster von Stamm 2 zeigte eine ca. 51%ige genetische Übereinstimmung mit den Stämmen 4, 3, 5, 7, 9, 1, 6 und 8.

4.12.3 Primer P 4

Abbildung 43: Agarosegelelektrophorese, Primer P 4. In der Spur, welche durch den Großbuchstaben M gekennzeichnet ist lief der Marker, in den mit 1 bis 9 bezeichneten Spuren die PCR-Produkte der jeweiligen *A. terreus*-Isolate.

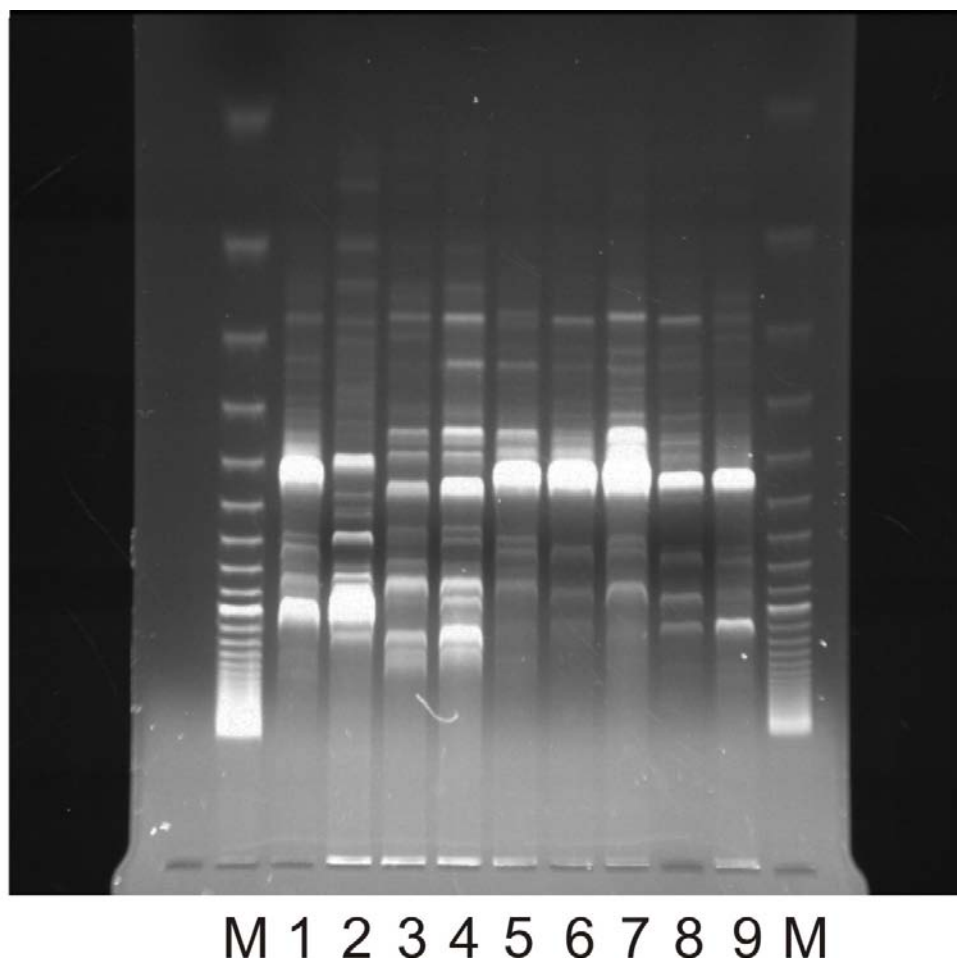
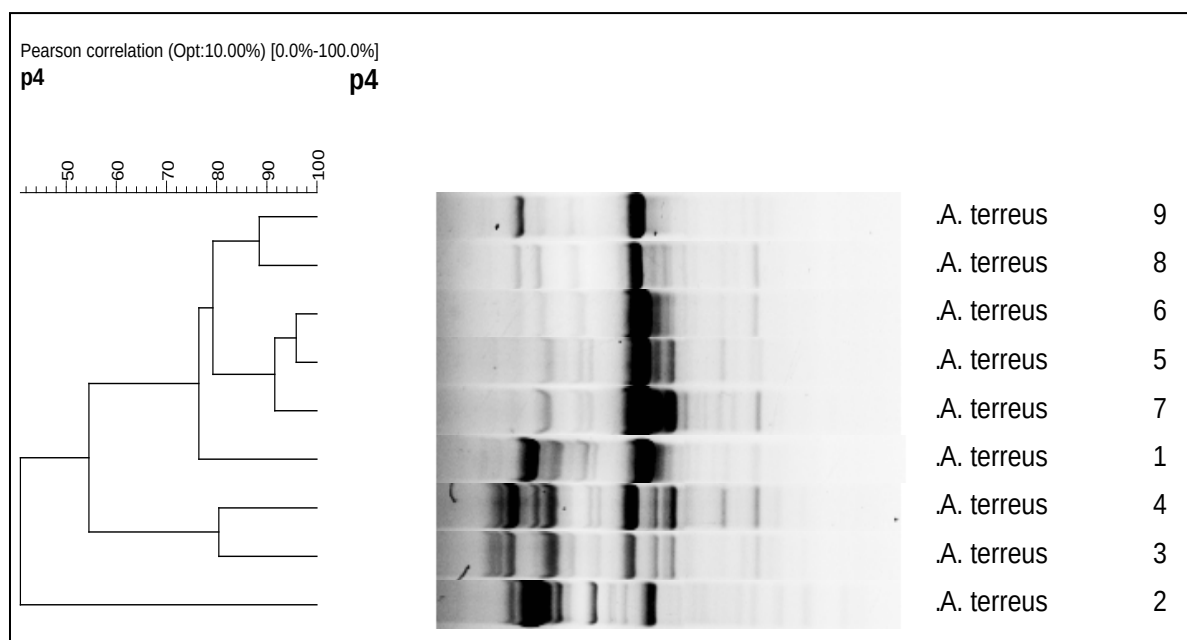


Abbildung 44: Dendrogramm, Primer P 4.



Unter der Verwendung von Primer P 4 ergaben sich die folgenden beschriebenen Verwandtschaftsverhältnisse unter den isolierten *A. terreus*-Stämmen.

Stamm 6 und 5 wiesen eine 96%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 6, 5 wiesen zu Stamm 7 eine 91%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 9 und 8 wiesen eine 88%ige genetische Übereinstimmung auf.

Die Stämme 8, 9, 6, 5 und 7 wiesen eine 79%ige genetische Übereinstimmung auf.

Die Stämme 8, 9, 6, 5, 7 und 1 wiesen eine 77%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 4 und 3 wiesen eine 80%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 3 und 4 wiesen zu den Stämmen 8, 9, 6, 5, 7 und 1 eine 54%ige genetische Übereinstimmung auf.

Stamm 2 wies zu den Stämmen 3, 4, 1, 7, 5, 6, 8 und 9 eine 41%ige genetische Übereinstimmung auf.

4.13 Verwandtschaftsgrade der mittels Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) untersuchten *A. terreus*-Stämme

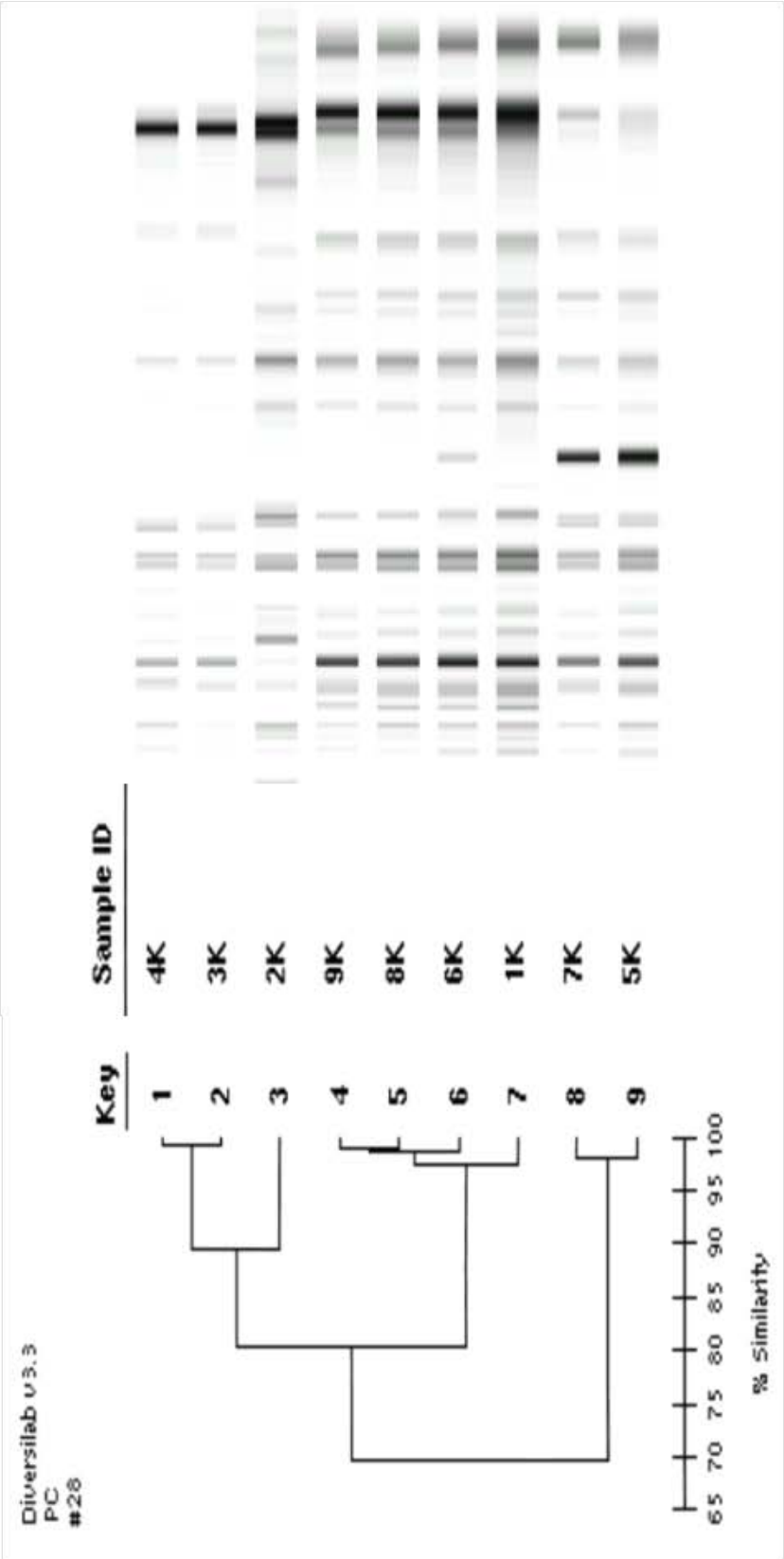
Eine mehr als 90%ige genetische Übereinstimmung und somit einen hohen Grad der Verwandtschaft wies *A. terreus*-Stamm 4 zu Stamm 3 auf.

Stamm 9, Stamm 6, Stamm 8 und Stamm 1 besaßen eine ebenso hohe genetische Übereinstimmung.

Die Stämme 7 und 5 waren zu über 95% genetisch identisch.

A. terreus-Stamm 3 besaß keine mehr als 90%ige zu einem der anderen genannten Stämme.

Abbildung 45: Dendrogramm, rep-PCR.



4.14 Zusammenfassende Beurteilung der einzelnen PCR-Ergebnisse

Durch die Kombination der einzelnen Ergebnisse der 3 PCR mit den Primern R 108, C II und P 4 konnten die *A. terreus*-Stämme einem bestimmten Kombinationstypen zugeordnet werden.

Aspergillus terreus-Stämmen, welche in einer der PCR eine mehr als 90%ige genetische Übereinstimmung aufwiesen, wurde dazu der gleiche Buchstabe zugeordnet. Somit ergab sich für jeden Stamm schließlich eine Kombination aus 3 Buchstaben, aus welcher wiederum ein kombinierter Typ gebildet werden konnte.

Tabelle 31: Ergebnisse der RAPD-Genotypisierung der 9 isolierten *A. terreus*-Stämme.

Isolatnummer	R 108-Typ	P 4-Typ	C II-Typ	Kombinierter Typ
1	A	A	A	I
2	B	B	B	II
3	C	C	C	III
4	D	D	D	IV
5	E	E	E	V
6	A	E	F	VI
7	F	E	G	VII
8	A	F	H	VIII
9	A	G	H	IX
Gesamtzahl	6	7	8	9

Insgesamt ergaben sich 9 kombinierte Typen. Darunter wiesen die *A. terreus*-Stämme 8 und 9 den höchsten Grad der Verwandtschaft auf, vollkommen identisch waren sie jedoch nicht und wiesen eine < 90% genetische Übereinstimmung unter Verwendung von Primer P 4 auf. Eine Betrachtung der Ergebnisse in kombinierter Form ergab folglich, dass keiner der isolierten Stämme der Klon eines der anderen isolierten Stämme war.

Die rep-PCR ergab, dass insgesamt 8 von 9 Stämmen zu mehr als 90% genetisch identisch sind. Folglich ergeben sich für die rep-PCR 2 Typen.

4.15 Amphotericin B-Empfindlichkeit der isolierten *A. terreus*-Stämme im Epsilon-Meter-Test

Tabelle 32: Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Amphotericin B für die gewonnenen *A. terreus*-Stämme im E-Test.

Probe Nr.	Amphotericin B MHK mit E-Test µg/ml
1	2,0
2	4,0
3	4,0
4	3,0
5	6,0
6	6,0
7	4,0
8	6,0
9	8,0

Als Referenzwert für die Amphotericin B-Empfindlichkeit im Etest gilt eine MHK ab einem Wert von 2µg/ml. Als empfindlich gelten Stämme, welche eine MHK unter 0,5µg/ml aufweisen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mehrzahl der Stämme eine MHK von entweder 4 µg/ml oder 6 µg/ml besaß. Somit waren alle 9 Stämme resistent gegenüber Amphotericin B.

5. Diskussion

Die vorliegende Studie zeigt, dass *Aspergillus terreus* an der Uniklinik Köln isoliert werden konnte. Insgesamt waren es über einen Zeitraum von 12 Monaten 9 Stämme; dies stellte einen Anteil von 0,2% der im gesamten Studienzeitraum isolierten Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) dar. *A. terreus* kommt folglich nicht ubiquitär in der Umgebung der Uniklinik vor. Die Mehrzahl der *A. terreus*-Stämme wurde im Innenbereich isoliert, davon wiederum stammte die Mehrzahl nicht von der hämato-onkologischen Station, sondern aus dem Foyer der Uniklinik. Dieses bot ganz andere Lebensbedingungen für diesen Pilz, aber auch die anderen Pilze, so beispielsweise Erde und Pflanzen, welche regelmäßig bewässert wurden sowie einen direkten Zugang zum Außenbereich. Für die isolierten *A. terreus*-Stämme ergaben sich aus einer Rekombination der Ergebnisse der RAPD-PCRs mit 3 verschiedenen Primern (R 108, P 4, C II) 9 verschiedene Typen, welche in keinem Fall zu mehr als 90% genetisch identisch waren. Bei den Stämmen handelte es sich folglich nicht um Klone eines Stammes. Vielmehr ist daraus zu schließen, dass eine genetische Vielfalt unter den Stämmen vorlag. Diese wurde bereits in anderen Studien beschrieben [11, 17, 61]. Eine gemeinsame Quelle als Ursprungsort der *A. terreus* konnte folglich ausgeschlossen werden.

Ein Vergleich der Ergebnisse der durchgeführten RAPD-PCRs mit jenem der rep-PCR zeigte, dass es mittels der RAPD-PCR und dem Einsatz 3 verschiedener Primer möglich ist, ein weitaus differenzierteres Ergebnis zu erzielen. Dies könnte sich auf die Eigenschaften der Primer R 108, P 4 und C II zurückführen lassen, welche für *A. terreus* ein gutes diskriminatorisches Potential besitzen [16, 17, 64]. Bei der rep-PCR wurde ein Primermix verwendet, welcher fertig im sogenannten „Aspergillus Kit“ (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) zu erwerben ist. Verschiedene Kits für verschiedene Arten von *Aspergillus* spp. existieren leider nicht, so dass der verwendete Primermix nicht spezifisch genug für *A. terreus* zu sein scheint. Welche Primer im Primermix enthalten sind, ist leider Firmengeheimnis der Firma bioMérieux (Nürtingen, Deutschland).

Alle isolierten *A. terreus*-Stämme waren resistent gegenüber Amphotericin B. Auch in anderen Studien wurde eine zunehmende *in vitro*-Resistenz gegen Amphotericin B bei *A. terreus*-Stämmen nachgewiesen [17, 18, 104]. Diese Problematik lag also auch bei den in Köln isolierten Stämmen vor. Eine Zunahme oder vielmehr das

Auftreten durch *A. terreus* verursachter invasiver Aspergillosen wurde in Köln jedoch innerhalb der Studienperiode gar nicht beobachtet. An den Standorten Innsbruck, Birmingham, Houston und 3 weiteren medizinischen Zentren in den USA [101] konnte eben diese Zunahme der *A. terreus*-Infektionen in der Vergangenheit beobachtet werden [11, 17, 61, 62].

Beurteilt man die niedrige Anzahl der *A. terreus*-Isolate, die Ergebnisse der RAPD-PCR und das nicht Vorhandensein durch *A. terreus* verursachter invasiver Aspergillosen zusammen, so kann jedoch ungeachtet der Ergebnisse der Amphotericin B-Resistenztestung festgehalten werden, dass *A. terreus* für die Patienten der Uniklinik Köln keinen relevanten pathogenen Keim darstellt.

An der Medizinischen Klinik Innsbruck wurde zwischen Oktober 2004 und Oktober 2005 eine unserer Untersuchung ähnelnde Beobachtungsstudie zu *A. terreus* durchgeführt [17]. Es konnten dort innerhalb eines Jahres insgesamt 49 *A. terreus*-Stämme isoliert werden. Davon stammten 30 Stämme aus der Außenluft in der Umgebung der Medizinischen Klinik, 4 Stämme aus dem untersuchten Innenraumbereichen und bei 14 Stämmen handelte es sich um klinische Isolate [17]. Jene Studie zeigt einerseits, dass auch an anderen Standorten die Keimzahl in der Außenluft ebenso größer ist, wie die Keimzahl im Innenraum, andererseits zeigt sie jedoch vielmehr, dass es standortabhängige Unterschiede, die für die Belastung der Umgebungsluft und das Auftreten der verschiedenen Genera und Pilzspecies verantwortlich zu sein scheinen, gibt. Diese Unterschiede scheinen von einer Vielzahl diverser Faktoren abhängig zu sein. Zu diesen Faktoren zählen beispielsweise die meteorologischen Parameter (s.u.) [13, 56, 70].

Hinsichtlich der Inzidenz invasiver Aspergillosen des Menschen dürfen die wirtsspezifischen Faktoren, der Immunstatus betroffener Patienten, der Gebrauch von systemisch wirksamen Antimykotika für die Prophylaxe und empirische Therapie nicht außer Acht gelassen werden.

Die Konzentration von *A. terreus* in der Umgebungsluft der Uniklinik Köln (0,75 KBE/m³/Monat) erscheint verglichen mit der Medizinischen Klinik Innsbruck, wo im Mittel 4,08 KBE/m³ je Monat isoliert wurden, gering [17]. Guinea *et al.* isolierten gleichsam nur eine geringe Anzahl *A. terreus*-Stämme. So wurden unter 369 *Aspergillus* spp.-Isolaten nur 2 *A. terreus*-Stämme isoliert [44]. *A. fumigatus* wurde an der Uniklinik Köln und in ihrer unmittelbaren Umgebung am häufigsten isoliert. Unter den insgesamt 3919 isolierten *Aspergillus*-KBE stellte diese Art einen

Gesamtanteil von 92,3% dar. Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur zu findenden Angaben überein [17, 44, 68]. *A. fumigatus* wird dort als die am häufigsten isolierte *Aspergillus*-Art beschrieben. *A. fumigatus* kommt ubiquitär in der Umgebungsluft der Uniklinik Köln vor.

A. niger konnte mit einem Anteil von 5,3% an der Gesamtzahl der isolierten *Aspergillus*-KBE am zweithäufigsten isoliert werden und war somit weitaus seltener als *A. fumigatus* vertreten. Leenders *et al.* identifizierten mehr als 90% der Isolate aus dem Außenbereich als *A. fumigatus* und insgesamt 5% als *A. niger*, die gleichen Arten konnten auch im Innenbereich gefunden werden [68].

A. flavus machte einen Anteil von 2,1% an der isolierten Gesamtzahl aus.

Insgesamt wurden mehr KBE von *A. flavus* und *A. niger* im Außenbereich (in absoluten Zahlen: *A. flavus*: 24 KBE; *A. niger*: 122 KBE) und im Foyer (in absoluten Zahlen: *A. flavus*: 58 KBE; *A. niger*: 43 KBE) zusammen isoliert, als im Stationsbereich (in absoluten Zahlen: *A. flavus*: 2 KBE; *A. niger*: 44 KBE). Diese Beobachtung scheint auf die unterschiedlichen ökologischen Nischen hinzuweisen, welche die verschiedenen Pilzspecies besiedeln [51]. *A. flavus* und *A. niger* finden sich bevorzugt auf und in der Umgebung pflanzlicher Materialien und im Erdboden [6, 33, 48, 116]. Diese Gegebenheiten finden sich nicht auf der hämatonkologischen Station. Betrachtet man hingegen die absoluten KBE-Zahlen von *A. fumigatus*, so wird ersichtlich, dass *A. fumigatus* in gleichsam hoher Anzahl im Innenraum (1109 KBE) als auch im Außenbereich (1687 KBE) isoliert werden konnte. Im Foyer konnten innerhalb der Beobachtungsperiode insgesamt 821 KBE isoliert werden. *A. fumigatus* ist typischerweise im Erdreich und auf faulenden organischen Substanzen zu finden. Unsere Studie und auch andere Studien [17, 44, 68] zeigten bereits, dass *A. fumigatus* zudem ein in der Umgebungsluft und im Staub ubiquitär vorkommender Pilz ist. Es ist zu vermuten, dass er aufgrund dieser Eigenschaften häufiger als die 3 anderen untersuchten Arten im Innenraum isoliert werden konnte.

A. niger und *A. flavus*, aber auch *A. fumigatus* und *A. terreus* könnten schließlich zusätzlich von außen in das Haus getragen worden sein. Es stellte sich die Frage nach einer passiven Verbreitung der Pilze im Haus durch die Besucher sowie das Pflegepersonal und Ärzte. Diese Theorie erscheint durch den Vergleich der Konzentration von *Aspergillus* spp. auf der Normalstation mit den isolierten KBE/m³ auf der KMT berechtigt. Die statistisch signifikanten Ergebnisse belegen, dass dort, wo weniger Besucherverkehr herrschte, wesentlich weniger Pilze isoliert wurden. Auf

der Isolierstation wurden je Monat im Mittel 3,8 KBE/m³ isoliert. Die Anzahl der KBE liegt deutlich unter jener, welche auf der „offenen“ Station (je Monat im Mittel 6,2 KBE/m³) gemessen wurde. Neben einer eigenen Klimaanlage inklusive Laminar Air Flow (LAF), tragen eine räumliche Abtrennung und eine Schleuse, in welcher Besucher und Personal Ihre Alltagskleidung ablegen und grüne OP-Bekleidung anlegen müssen sowie regelmäßige und gründliche Reinigung der Station zu einer erheblichen Reduktion der Luftbelastung mit *Aspergillus* spp. bei. Eine ebenso bedeutende Reduktion der Keime in der Innenraumluft zeigten ähnliche Untersuchungen an Kliniken und in Abteilungen, welche mit einem HEPA-System und/oder auch mit einem Laminar-Air-System ausgestattet waren [17, 30, 67, 68]. Es ist also nicht von der Hand zu weisen, dass solche Anlagen die Keimzahl/m³ Luft effektiv verringern. Es bleibt jedoch die Frage, ob eine Reduktion der KBE/m³ im Innenraum eine Erkrankung der Patienten verhindert. Denn es könnte ebenso sein, dass die Patienten bereits vor der stationären Aufnahme mit einem Pilz besiedelt sind. Infolge der immunsupprimierenden Therapie und Erkrankung kommt es dann zu einer Entstehung einer invasiven Aspergillose [67, 68]. Daneben besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den auf der Station isolierten Pilzen, insbesondere *A. fumigatus*, da dieser in der Mehrzahl isoliert wurde, um Klone eines Stammes handelt. Diese könnten sich von einem Ursprungsort ausbreiten. Es zeigte sich, dass die RAPD-PCR eine schnelle und zuverlässige Methode ist um *Aspergillus* spp. zu typisieren und somit zu klären, ob es sich bei den Isolaten um Klone eines Stammes handelt oder eine große genetische Vielfalt besteht [5, 17, 64, 67, 68]. Bedauerlicherweise wurde die molekulargenetische Untersuchung aller anderen 3910 *Aspergillus* spp.-Isolate nicht durchgeführt, sodass sich bereits für zukünftige Projekte neue Frage- und Aufgabenstellungen ergeben. Letztlich dürfen die zum Zeitpunkt der Messungen im Bettenhaus durchgeführten Baumaßnahmen nicht außer Acht gelassen werden. Wie Cornet *et al.* und Goodley *et al.* zeigten, kann auch hierdurch eine höhere Keimzahl im Innenbereich auftreten [30, 43, 102].

Wir fanden einen signifikanten Unterschied zwischen der Dichte von *Aspergillus* spp. aus dem Außenbereich und der Dichte von *Aspergillus* spp. auf der hämatoonkologischen Station. Die Anzahl der KBE/m³ pro Monat auf der Station lag im Mittel für den kompletten Beobachtungszeitraum bei einem Wert von 4,6 KBE/m³. Für den Außenbereich ergab sich im Mittel für die Konzentration von *Aspergillus* spp. innerhalb der 12 Monate ein Wert von 17,5 KBE/m³ je Monat. Im Außenbereich

konnten also durchschnittlich 12,9 KBE/m³ mehr isoliert werden. Das Ergebnis einer geringeren Konzentration von *Aspergillus* spp. auf der hämatookologischen Station mag aufgrund gegebener Vorschriften zur Isolation von der Umwelt (Fenster können nicht geöffnet werden, Pflanzen und Blumen dürfen nicht mitgebracht bzw. aufgestellt werden) zustande gekommen sein. Leenders *et al.* diskutierten diesen Punkt bereits in ihrer Studie über die Konzentration und molekulare Epidemiologie von *Aspergillus* spp in der Luft und einen Zusammenhang mit dem Auftauchen von Infektionen, hervorgerufen durch *Aspergillus* spp. [68]. Jene Studie sah jedoch keinen Zusammenhang zwischen den Jahreszeiten und der Konzentration von *Aspergillus* spp. [68], wohingegen wir, als auch andere Studien [17, 44, 70] einen möglichen Zusammenhang sahen. Insgesamt wurden in den Sommer- und Herbstmonaten mehr KBE/m³ isoliert als in den Winter- und Frühjahrsmonaten. Im Sommer und Herbst waren die Temperaturen im Mittel höher als im Frühjahr und Winter. Es zeigte sich, dass die *Aspergillus* spp. Konzentration mit steigenden Temperaturen stieg und mit fallenden Temperaturen wiederum sank. Eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von *Aspergillus* spp. und der Temperatur sahen Guinea *et al.* [44]. Desweiteren konnten sie zeigen, dass mit zunehmender Windgeschwindigkeit die Konzentration von *Aspergillus* spp. sank [44]. Dies zeigte sich auch bei unseren Beobachtungen und ist möglicherweise auf das hohe Volumen von 50L, welches wir je Minute sammelten und die somit kurze Messzeit zurückzuführen, ähnliche Beobachtungen und Überlegungen beschrieben bereits Guinea *et al.* [44]. Wir beobachteten, dass die *Aspergillus* Konzentration zudem hoch war, wenn die Luftfeuchtigkeit niedrig war und der Taupunkt im Mittel zwischen 3 und 5°C lag. Diese Gegebenheiten fanden sich auch im Sommer und Herbst. Dieses Ergebnis mag darauf zurückzuführen sein, dass jene beiden Parameter von der Temperatur abhängig sind [112, 113].

Insgesamt ergab die statistische Auswertung der an der Uniklinik Köln erhobenen Werte signifikante Ergebnisse für eine Korrelation von relativer Luftfeuchtigkeit und dem Faktor Jahreszeit (Frühling, Sommer, Herbst und Winter) mit der Dichte von *Aspergillus* spp., Leenders *et al.* [68] konnten diesen Zusammenhang nicht nachweisen. Hierbei ist zu erwähnen, dass es sich bei den Jahreszeiten um das komplexe Zusammenspiel verschiedener astronomischer und klimatischer Parameter handelt [110].

Für die übrigen Variablen (Temperatur, Taupunkt, Windgeschwindigkeit, Luftdruck) konnte keine Korrelation nachgewiesen werden. Guinea *et al.* [44] hingegen zeigten durch ihre Untersuchungen, dass die Konzentration der Aspergillussporen mit steigenden Temperaturen zunahm und bei erhöhten Windgeschwindigkeiten wiederum abnahm.

Innerhalb des Beobachtungsjahres konnten 855 Nasenabstriche von Patienten gewonnen werden. Lediglich ein einziger Abstrich war positiv und zeigte das Wachstum von *A. niger*. Der betroffene Patient erkrankte nicht an einer Aspergillose. Einige der Patienten, welche negative Nasenabstriche aufwiesen, erkrankten jedoch an einer Aspergillose. Auch Blum *et al.* beschrieben einen niedrigen positiv prädiktiven Wert für das Screening der oberen Luftwege bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen. Aus diesen Ergebnissen kann auf der einen Seite der Schluss gezogen werden, dass ein Nasenabstrich aus dem vorderen Nasenabschnitt nicht dazu geeignet ist eine Besiedlung des oberen Respirationstraktes mit *Aspergillus* spp. festzustellen und sich folglich nicht als Screeningmethode eignet. Auf der anderen Seite zeigt das Ergebnis auch, dass Pilzsporen, aufgrund Ihrer geringen Größe, vermutlich nicht im oberen Respirationstrakt verbleiben. Für den Nachweis von *Aspergillus* spp. und anderen Pilzen in den tiefen Anteilen des Respirationstrakts existieren bereits einige Untersuchungsverfahren [65], so zum Beispiel die Bronchiallavage, die Sputumuntersuchung sowie die Biopsie. Eine Bronchiallavage oder Sputum bieten jedoch ein gewisses Kontaminationsrisiko, da – wie wir zeigen konnten – z. B. *A. fumigatus* ubiquitär in der Umgebungsluft der Uniklinik Köln zu finden ist und isoliert werden kann. Die Biopsie stellt eine sterile Nachweismethode dar. Sie ist jedoch ein invasives Untersuchungsverfahren und birgt daher ihrerseits Gefahren. Oftmals kann sie aufgrund einer bestehenden Thrombozytopenie nicht durchgeführt werden [65], zudem besteht hier auch die Gefahr einer Inokulation von Erregern. Als Screeningmethoden sind diese Verfahren nicht geeignet. Daneben steht die Frage im Raum, welchen Nutzen oder vielmehr welche Konsequenzen eine Feststellung einer Besiedlung des Respirationstraktes mit *Aspergillus* spp. vor Krankheitsbeginn hätte. Eine bloße Besiedlung allein kann nicht hinweisgebend auf ein bestehendes Erkrankungsrisiko sein, zumal ungeklärt ist, welche Anzahl koloniebildender Einheiten überhaupt notwendig ist, um an einer Aspergillose zu erkranken [54]. Es stellt sich zum Beispiel die Frage, ob ein asymptomatischer Patient mit kolonisiertem

Respirationstrakt einer spezifischen Therapie zugeführt werden würde und könnte oder doch besser eine Prophylaxe erhalten sollte? Wählte man letzteres so erscheint eine Diagnostik hinsichtlich einer Besiedlung vor Krankheitsbeginn eher als nicht sinnvoll. Zum einen würde das damit verbundene Komplikationsrisiko für den Patienten größer sein, als der daraus zu ziehende Nutzen und zum anderen würde ein wirtschaftlicher Kostenpunkt entstehen, welcher unbegründet wäre. Eine prophylaktische Therapie kann zudem ohne das Wissen, ob und welcher Keim vorliegt, bei entsprechender Risikokonstellation verabreicht werden [90, 106]. Daneben ist sicherlich fraglich, ob die Elimination des einen Pilzes nicht etwa einer anderen Art oder einem anderen Erreger eine neue ökologische Nische eröffnet würde? Die Suche nach einem für den Patienten schonenden, einfach durchzuführenden und kostengünstigen Screeningverfahren um eine Koloniesierung des Respirationstraktes mit *Aspergillus* spp. und anderen Pilzen festzustellen ist eine weiter bestehende Aufgabe. Letztlich bleibt jedoch noch die Frage offen, ob ein Screeningverfahren bei den guten Ergebnissen, welche im Rahmen der Pilzprophylaxe erzielt werden konnten [29], zukünftig überhaupt noch nötig sein wird.

6. Zusammenfassung

Die invasive Aspergillose (IA) ist zu einem der Hauptgründe für die Morbidität und Mortalität immunsupprimierter Patienten geworden. *Aspergillus fumigatus* ist bei vorliegender IA der am häufigsten isolierte Pilz, gefolgt von *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus terreus*. *Aspergillus terreus* im Einzelnen weist sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eine Resistenz gegen Amphotericin B (AmB) auf und gibt damit Grund zur Sorge für die Therapie infizierter Patienten. *A. terreus* ist im Allgemeinen in der Minderheit der Fälle für eine IA verantwortlich, jedoch schwankt die Inzidenz an diversen Klinikstandorten. Auch für die Häufigkeitsverteilung der anderen genannten Aspergillusarten gibt es geographische Unterschiede, so dass man annimmt, dass die Belastung der Umwelt, Gattung und Verteilung der Pilze von diversen Faktoren abhängig ist, so zum Beispiel von Jahreszeit, Windgeschwindigkeit, Temperatur und Luftfeuchtigkeit.

In der vorliegenden Studie wurden für eine Periode von 12 Monaten, zwischen Dezember 2007 und November 2008, Luftmessungen an diversen kritischen Expositionspunkten innerhalb sowie außerhalb des Universitätsklinikums Köln durchgeführt. Daneben wurden Patienten mittels Nasenabstrich auf die Besiedlung des Respirationstraktes mit *Aspergillus* spp. gescreent. Es fand eine molekulargenetische Untersuchung der *A. terreus* Isolate mittels rep-PCR und RAPD-PCR statt sowie eine Amphotericin B-Resistenztestung. Das Hauptziel war es mehr über die Epidemiologie von *Aspergillus* spp. und insbesondere über die Rolle von *A. terreus* als möglicher Krankheitserreger der invasiven Aspergillose an der Uniklinik Köln herauszufinden.

Insgesamt wurden 3919 *Aspergillus*-Stämme isoliert. Die Ergebnisse zeigten, dass *A. fumigatus* mit einem Anteil an der Gesamtzahl der isolierten *Aspergillus*-Stämme von 92,3% ein ubiquitär in der Luft in und um die Uniklinik Köln vorkommender Pilz ist. Das Vorkommen von *A. terreus* hingegen war schwindend gering (0,2%). Daneben zeigten alle 9 Isolate eine Resistenz gegenüber Amphotericin B. Die molekulargenetische Untersuchung der Isolate ergab, dass es sich bei diesen nicht um die Klone eines Stammes handelte, vielmehr lag eine genetische Vielfalt vor. Der Vergleich der Ergebnisse aus rep- und RAPD-PCR ließen zusätzlich auf ein besseres diskriminatorisches Potential der Primer R108, CII und P4, welche im Rahmen der RAPD-PCR verwendet wurden, schließen. Zusammenfassend handelt

es sich bei *A. terreus* um keinen relevanten pathogenen Keim für die Patienten mit malignen hämatoonkologischen Erkrankungen an der Uniklinik Köln ist.

Innerhalb des Studienzeitraums wurden 855 Nasenabstriche genommen. Von diesen war nur ein einziger positiv für das Wachstum auf *A. niger*. Der betroffene Patient entwickelte keine invasive Aspergillose, wohingegen negativ getestete Patienten wiederum eine invasive Aspergillose entwickelten. Abstriche, insbesondere Nasenabstriche aus dem oberen Respirationstrakt eignen sich somit nicht als Screeninguntersuchung für die Besiedlung mit *Aspergillus* spp.

Neben Pilzsporen wurden auch Daten zu meteorologischen Gegebenheiten zum Zeitpunkt der Messungen gesammelt. Temperatur, Windgeschwindigkeit, Luftdruck und Taupunkt allein zeigten in der statistischen Auswertung keine positive Korrelation mit der Dichte von *Aspergillus* spp. Vielmehr zeigte sich, dass ein Zusammenspiel dieser Parameter im Rahmen der Jahreszeiten durchaus einen Einfluss auf die Dichte nehmen. Darüberhinaus zeigte sich eine Korrelation zwischen der relativen Luftfeuchtigkeit und der Sporenkonzentration mit einer Zunahme der Konzentration während trockener Perioden. Das Vorhandensein von *Aspergillus* spp. in der Umgebungsluft ist folglich abhängig von dem komplexen Zusammenspiel der jahreszeitlichen Bedingungen und den örtlichen Gegebenheiten.

Ein ebenso komplexes Zusammenspiel wird bei der Entstehung der invasiven Aspergillose vermutet. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, insbesondere zu möglichen Screeningverfahren.

7. Literaturverzeichnis

1. Abarca, M.L., [Taxonomy and identification of the species involved in nosocomial aspergillosis]. Rev Iberoam Micol, 2000. **17**(3): p. S79-84.
2. Abarca, M.L., F. Accensi, J. Cano, and F.J. Cabanes, Taxonomy and significance of black aspergilli. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004. **86**(1): p. 33-49.
3. Amitani, R., G. Taylor, E.N. Elezis, C. Llewellyn-Jones, J. Mitchell, F. Kuze, P.J. Cole, and R. Wilson, Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. Infect Immun, 1995. **63**(9): p. 3266-71.
4. Anaissie, E. and G.P. Bodey, Nosocomial fungal infections. Old problems and new challenges. Infect Dis Clin North Am, 1989. **3**(4): p. 867-82.
5. Anderson, M.J., K. Gull, and D.W. Denning, Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(1): p. 87-93.
6. Andreoni, S., C. Farina, and G. Lombardi, Medical Mycology Atlas.
7. Araiza, J., P. Canseco, and A. Bonifaz, Otomycosis: clinical and mycological study of 97 cases. Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord), 2006. **127**(4): p. 251-4.
8. Arnow, P.M., M. Sadigh, C. Costas, D. Weil, and R. Chudy, Endemic and epidemic aspergillosis associated with in-hospital replication of *Aspergillus* organisms. J Infect Dis, 1991. **164**(5): p. 998-1002.
9. Arruda, L.K., B.J. Mann, and M.D. Chapman, Selective expression of a major allergen and cytotoxin, *Asp f I*, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. J Immunol, 1992. **149**(10): p. 3354-9.
10. Ascoglu, S., J.H. Rex, B. de Pauw, J.E. Bennett, J. Bille, F. Crokaert, D.W. Denning, J.P. Donnelly, J.E. Edwards, Z. Erjavec, D. Fiere, O. Lortholary, J. Maertens, J.F. Meis, T.F. Patterson, J. Ritter, D. Selleslag, P.M. Shah, D.A. Stevens, and T.J. Walsh, Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis, 2002. **34**(1): p. 7-14.
11. Baddley, J.W., P.G. Pappas, A.C. Smith, and S.A. Moser, Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. J Clin Microbiol, 2003. **41**(12): p. 5525-9.
12. Balajee, S.A., *Aspergillus terreus* complex. Med Mycol, 2009. **47 Suppl 1**: p. S42-6.
13. Basilico Mde, L., C. Chiericatti, E.E. Aringoli, R.L. Althaus, and J.C. Basilico, Influence of environmental factors on airborne fungi in houses of Santa Fe City, Argentina. Sci Total Environ, 2007. **376**(1-3): p. 143-50.
14. bioMérieux, Instructions for Use of LabChip® Devices. 2007.
15. bioMérieux, DiversiLab™ Recommendations for Mo Bio UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit 2007.
16. Birch, M. and D.W. Denning, Molecular typing of *Aspergillus terreus* by random amplification of polymorphic DNA. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999. **18**(11): p. 838-41.
17. Blum, G., S. Perkhofer, K. Grif, A. Mayr, G. Kropshofer, D. Nachbaur, R. Kafka-Ritsch, M.P. Dierich, and C. Lass-Flörl, A 1-year *Aspergillus terreus* surveillance study at the University Hospital of Innsbruck: molecular typing of environmental and clinical isolates. Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(12): p. 1146-51.
18. Blum, G., S. Perkhofer, H. Haas, M. Schrettl, R. Wurzner, M.P. Dierich, and C. Lass-Flörl, Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(4): p. 1553-5.
19. Bodey, G., B. Bueltmann, W. Duguid, D. Gibbs, H. Hanak, M. Hotchi, G. Mall, P. Martino, F. Meunier, S. Milliken, and et al., Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992. **11**(2): p. 99-109.
20. Bodey, G.P. and S. Vartivarian, Aspergillosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1989. **8**(5): p. 413-37.

21. Bouza, E., J. Guinea, T. Pelaez, J. Perez-Molina, L. Alcala, and P. Munoz, *Workload due to Aspergillus fumigatus and significance of the organism in the microbiology laboratory of a general hospital*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2075-9.
22. Bradley, J.C., J.G. George, J.C. Sarria, R.C. Kimbrough, and K.T. Mitchell, *Aspergillus terreus endophthalmitis*. Scand J Infect Dis, 2005. **37**(6-7): p. 529-31.
23. Brown, M.J., S.A. Worthy, J.D. Flint, and N.L. Muller, *Invasive aspergillosis in the immunocompromised host: utility of computed tomography and bronchoalveolar lavage*. Clin Radiol, 1998. **53**(4): p. 255-7.
24. Camps, I.R., *Risk factors for invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplantation*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32 Suppl 2**: p. S119-23.
25. Caston-Osorio, J.J., A. Rivero, and J. Torre-Cisneros, *Epidemiology of invasive fungal infection*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32 Suppl 2**: p. S103-9.
26. Caston, J.J., M.J. Linares, C. Gallego, A. Rivero, P. Font, F. Solis, M. Casal, and J. Torre-Cisneros, *Risk factors for pulmonary Aspergillus terreus infection in patients with positive culture for filamentous fungi*. Chest, 2007. **131**(1): p. 230-6.
27. Chamilos, G., M. Luna, R.E. Lewis, G.P. Bodey, R. Chemaly, J.J. Tarrand, A. Safdar, Raad, II, and D.P. Kontoyiannis, *Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003)*. Haematologica, 2006. **91**(7): p. 986-9.
28. Chazalet, V., J.P. Debeaupuis, J. Sarfati, J. Lortholary, P. Ribaud, P. Shah, M. Cornet, H. Vu Thien, E. Gluckman, G. Brucker, and J.P. Latge, *Molecular typing of environmental and patient isolates of Aspergillus fumigatus from various hospital settings*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(6): p. 1494-500.
29. Cornely, O.A., J. Maertens, D.J. Winston, J. Perfect, A.J. Ullmann, T.J. Walsh, D. Helfgott, J. Holowiecki, D. Stockelberg, Y.T. Goh, M. Petrini, C. Hardalo, R. Suresh, and D. Angulo-Gonzalez, *Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia*. N Engl J Med, 2007. **356**(4): p. 348-59.
30. Cornet, M., V. Levy, L. Fleury, J. Lortholary, S. Barquins, M.H. Coureul, E. Deliere, R. Zittoun, G. Brucker, and A. Bouvet, *Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or laminar airflow against Aspergillus airborne contamination during hospital renovation*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1999. **20**(7): p. 508-13.
31. Costa, C., J.M. Costa, C. Desterke, F. Botterel, C. Cordonnier, and S. Bretagne, *Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(6): p. 2224-7.
32. Curtis, L., S. Cali, L. Conroy, K. Baker, C.H. Ou, R. Hershow, F. Norlock-Cruz, and P. Scheff, *Aspergillus surveillance project at a large tertiary-care hospital*. J Hosp Infect, 2005. **59**(3): p. 188-96.
33. de Hoog, G.S., J. Guarro, J. Gené, and M.J. Figueras, *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd Edition ed. 2000.
34. De Lucca, A.J., *Harmful fungi in both agriculture and medicine*. Rev Iberoam Micol, 2007. **24**(1): p. 3-13.
35. De Pauw, B., T.J. Walsh, J.P. Donnelly, D.A. Stevens, J.E. Edwards, T. Calandra, P.G. Pappas, J. Maertens, O. Lortholary, C.A. Kauffman, D.W. Denning, T.F. Patterson, G. Maschmeyer, J. Bille, W.E. Dismukes, R. Herbrecht, W.W. Hope, C.C. Kibbler, B.J. Kullberg, K.A. Marr, P. Munoz, F.C. Odds, J.R. Perfect, A. Restrepo, M. Ruhnke, B.H. Segal, J.D. Sobel, T.C. Sorrell, C. Viscoli, J.R. Wingard, T. Zaoutis, and J.E. Bennett, *Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(12): p. 1813-21.
36. Denning, D.W., *Invasive aspergillosis*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(4): p. 781-803; quiz 804-5.
37. Denning, D.W., *Early diagnosis of invasive aspergillosis*. Lancet, 2000. **355**(9202): p. 423-4.

38. Denning, D.W., C.C. Kibbler, and R.A. Barnes, *British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(4): p. 230-40.
39. Donnelly, J.P., *Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(4): p. 487-9.
40. Ebina, K., S. Ichinowatari, and K. Yokota, *Studies on toxin of Aspergillus fumigatus. XXII. Fashion of binding of Asp-hemolysin to human erythrocytes and Asp-hemolysin-binding proteins of erythrocyte membranes*. Microbiol Immunol, 1985. **29**(2): p. 91-101.
41. Ebina, K., H. Sakagami, K. Yokota, and H. Kondo, *Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding Asp-hemolysin from Aspergillus fumigatus*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1219**(1): p. 148-50.
42. Eggimann, P., J.C. Chevrolet, M. Starobinski, P. Majno, M. Totsch, B. Chapuis, and D. Pittet, *Primary invasive aspergillosis of the digestive tract: report of two cases and review of the literature*. Infection, 2006. **34**(6): p. 333-8.
43. Goodley, J.M., Y.M. Clayton, and R.J. Hay, *Environmental sampling for aspergilli during building construction on a hospital site*. J Hosp Infect, 1994. **26**(1): p. 27-35.
44. Guinea, J., T. Pelaez, L. Alcala, and E. Bouza, *Outdoor environmental levels of Aspergillus spp. conidia over a wide geographical area*. Med Mycol, 2006. **44**(4): p. 349-56.
45. Hachem, R.Y., D.P. Kontoyiannis, M.R. Boktour, C. Afif, C. Cooksley, G.P. Bodey, I. Chatzinikolaou, C. Perego, H.M. Kantarjian, and Raad, II, *Aspergillus terreus: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies*. Cancer, 2004. **101**(7): p. 1594-600.
46. Havlickova, B., V.A. Czaika, and M. Friedrich, *Epidemiological trends in skin mycoses worldwide*. Mycoses, 2008. **51** Suppl 4: p. 2-15.
47. Healy, M., K. Reece, D. Walton, J. Huong, K. Shah, and D.P. Kontoyiannis, *Identification to the species level and differentiation between strains of Aspergillus clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(9): p. 4016-24.
48. Hedayati, M.T., A.C. Pasqualotto, P.A. Warn, P. Bowyer, and D.W. Denning, *Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 6): p. 1677-92.
49. Herbrecht, R., D.W. Denning, T.F. Patterson, J.E. Bennett, R.E. Greene, J.W. Oestmann, W.V. Kern, K.A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R.H. Rubin, J.R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P.H. Chandrasekar, M.R. Hodges, H.T. Schlamm, P.F. Troke, and B. de Pauw, *Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 408-15.
50. Heussel, C.P., H.U. Kauczor, G.E. Heussel, B. Fischer, M. Begrich, P. Mildenerger, and M. Thelen, *Pneumonia in febrile neutropenic patients and in bone marrow and blood stem-cell transplant recipients: use of high-resolution computed tomography*. J Clin Oncol, 1999. **17**(3): p. 796-805.
51. Hof, H., *Mykologie für Mediziner Grundlagen - Pathogenese - Manifestationen - Diagnostik - Therapie*. 2003, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
52. Hof, H., L. Müller, and R. Dörries, *Mikrobiologie*. 2000, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
53. Hope, W.W., T.J. Walsh, and D.W. Denning, *Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(10): p. 609-22.
54. Hospenthal, D.R., K.J. Kwon-Chung, and J.E. Bennett, *Concentrations of airborne Aspergillus compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation*. Med Mycol, 1998. **36**(3): p. 165-8.
55. Iwen, P.C., M.E. Rupp, A.N. Langnas, E.C. Reed, and S.H. Hinrichs, *Invasive pulmonary aspergillosis due to Aspergillus terreus: 12-year experience and review of the literature*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(5): p. 1092-7.

56. Jones, A.M. and R.M. Harrison, *The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations--a review*. Sci Total Environ, 2004. **326**(1-3): p. 151-80.
57. Kauczor, H.U., M. Schnutgen, B. Fischer, H.C. Schwickert, S. Hartel, S. Schadmand-Fischer, G. Gerken, and F. Schweden, *[Pulmonary manifestations in HIV patients: role of thoracic radiography, CT and HRCT]*. Rofo, 1995. **162**(4): p. 282-7.
58. Krishnan, S., E.K. Manavathu, and P.H. Chandrasekar, *Aspergillus flavus: an emerging non-fumigatus Aspergillus species of significance*. Mycoses, 2009.
59. Kunel'skaia, V. and G.B. Shadrin, *[Middle ear mycosis]*. Vestn Otorinolaringol, 2004(1): p. 57-60.
60. Lasker, B.A., *Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of Aspergillus fumigatus isolates*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(8): p. 2886-92.
61. Lass-Flörl, C., K. Grif, and D.P. Kontoyiannis, *Molecular typing of Aspergillus terreus isolates collected in Houston, Texas, and Innsbruck, Austria: evidence of great genetic diversity*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(8): p. 2686-90.
62. Lass-Flörl, C., K. Grif, A. Mayr, A. Petzer, G. Gastl, H. Bonatti, M. Freund, G. Kropshofer, M.P. Dierich, and D. Nachbaur, *Epidemiology and outcome of infections due to Aspergillus terreus: 10-year single centre experience*. Br J Haematol, 2005. **131**(2): p. 201-7.
63. Lass-Flörl, C., G. Kofler, G. Kropshofer, J. Hermans, A. Kreczy, M.P. Dierich, and D. Niederwieser, *In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis*. J Antimicrob Chemother, 1998. **42**(4): p. 497-502.
64. Lass-Flörl, C., P. Rath, D. Niederwieser, G. Kofler, R. Würzner, A. Kreczy, and M.P. Dierich, *Aspergillus terreus infections in haematological malignancies: molecular epidemiology suggests association with in-hospital plants*. J Hosp Infect, 2000. **46**(1): p. 31-5.
65. Latge, J.P., *Aspergillus fumigatus and aspergillosis*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(2): p. 310-50.
66. Latge, J.P., *The pathobiology of Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol, 2001. **9**(8): p. 382-9.
67. Leenders, A., A. van Belkum, S. Janssen, S. de Marie, J. Kluytmans, J. Wielenga, B. Lowenberg, and H. Verbrugh, *Molecular epidemiology of apparent outbreak of invasive aspergillosis in a hematology ward*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(2): p. 345-51.
68. Leenders, A.C., A. van Belkum, M. Behrendt, A. Luijendijk, and H.A. Verbrugh, *Density and molecular epidemiology of Aspergillus in air and relationship to outbreaks of Aspergillus infection*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(6): p. 1752-7.
69. Leutner, C., J. Gieseke, G. Lutterbey, C.K. Kuhl, S. Flacke, A. Glasmacher, A. Theisen, E. Wardelmann, C. Grohe, and H.H. Schild, *[MRT versus CT in the diagnosis of pneumonias: an evaluation of a T2-weighted ultrafast turbo-spin-echo sequence (UTSE)]*. Rofo, 1999. **170**(5): p. 449-56.
70. Li, D.W. and B. Kendrick, *A year-round study on functional relationships of airborne fungi with meteorological factors*. Int J Biometeorol, 1995. **39**(2): p. 74-80.
71. Maertens, J., J. Verhaegen, K. Lagrou, J. Van Eldere, and M. Boogaerts, *Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation*. Blood, 2001. **97**(6): p. 1604-10.
72. Marjani, M., P. Tabarsi, K. Najafizadeh, F.R. Farokhi, B. Sharifkashani, S. Motahari, A. Abbasi, M.R. Masjedi, and D. Mansouri, *Pulmonary aspergillosis in solid organ transplant patients: a report from iran*. Transplant Proc, 2008. **40**(10): p. 3663-7.
73. Marr, K.A., R.A. Carter, M. Boeckh, P. Martin, and L. Corey, *Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4358-66.
74. Maschmeyer, G., *The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats*. Int J Antimicrob Agents, 2006. **27** Suppl 1: p. 3-6.

75. Maschmeyer, G., A. Haas, and O.A. Cornely, *Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients*. Drugs, 2007. **67**(11): p. 1567-601.
76. Mavor, A.L., S. Thewes, and B. Hube, *Systemic fungal infections caused by Candida species: epidemiology, infection process and virulence attributes*. Curr Drug Targets, 2005. **6**(8): p. 863-74.
77. McAleer WJ, B.E., Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR., *Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast*. Nature, 1984. **307**: p. 178-180.
78. Monod, M., S. Paris, J. Sarfati, K. Jaton-Ogay, P. Ave, and J.P. Latge, *Virulence of alkaline protease-deficient mutants of Aspergillus fumigatus*. FEMS Microbiol Lett, 1993. **106**(1): p. 39-46.
79. Morgan, J., K.A. Wannemuehler, K.A. Marr, S. Hadley, D.P. Kontoyiannis, T.J. Walsh, S.K. Fridkin, P.G. Pappas, and D.W. Warnock, *Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program*. Med Mycol, 2005. **43 Suppl 1**: p. S49-58.
80. Mullins, J., R. Harvey, and A. Seaton, *Sources and incidence of airborne Aspergillus fumigatus (Fres)*. Clin Allergy, 1976. **6**(3): p. 209-17.
81. Mullins, J., P.S. Hutcheson, and R.G. Slavin, *Aspergillus fumigatus spore concentration in outside air: Cardiff and St Louis compared*. Clin Allergy, 1984. **14**(4): p. 351-4.
82. Nolard, N., *[Links between risks of aspergillosis and environmental contamination. Review of the literature]*. Pathol Biol (Paris), 1994. **42**(7): p. 706-10.
83. Pagano, L., M. Caira, A. Candoni, M. Offidani, L. Fianchi, B. Martino, D. Pastore, M. Picardi, A. Bonini, A. Chierichini, R. Fanci, C. Caramatti, R. Invernizzi, D. Mattei, M.E. Mitra, L. Melillo, F. Aversa, M.T. Van Lint, P. Falcucci, C.G. Valentini, C. Girmenia, and A. Nosari, *The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study*. Haematologica, 2006. **91**(8): p. 1068-75.
84. Palestro, C.J. and M.A. Torres, *Radionuclide imaging of nonosseous infection*. Q J Nucl Med, 1999. **43**(1): p. 46-60.
85. Pappas, P.G., *Invasive candidiasis*. Infect Dis Clin North Am, 2006. **20**(3): p. 485-506.
86. Perfect, J.R., G.M. Cox, J.Y. Lee, C.A. Kauffman, L. de Repentigny, S.W. Chapman, V.A. Morrison, P. Pappas, J.W. Hiemenz, and D.A. Stevens, *The impact of culture isolation of Aspergillus species: a hospital-based survey of aspergillosis*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(11): p. 1824-33.
87. Pitt, J.I., *The current role of Aspergillus and Penicillium in human and animal health*. J Med Vet Mycol, 1994. **32 Suppl 1**: p. 17-32.
88. Qiagen, *DNeasy Blood & Tissue Handbook*. 2006.
89. Ribaud, P., C. Chastang, J.P. Latge, L. Baffroy-Lafitte, N. Parquet, A. Devergie, H. Esperou, F. Selimi, V. Rocha, F. Derouin, G. Socie, and E. Gluckman, *Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation*. Clin Infect Dis, 1999. **28**(2): p. 322-30.
90. Ruping, M.J., J.J. Vehreschild, and O.A. Cornely, *Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat*. Drugs, 2008. **68**(14): p. 1941-62.
91. Sanguinetti, M., B. Posteraro, L. Pagano, G. Pagliari, L. Fianchi, L. Mele, M. La Sorda, A. Franco, and G. Fadda, *Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(8): p. 3922-5.
92. Saugier-Verber, P., A. Devergie, A. Sulahian, P. Ribaud, F. Traore, H. Bourdeau-Esperou, E. Gluckman, and F. Derouin, *Epidemiology and diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in bone marrow transplant patients: results of a 5 year retrospective study*. Bone Marrow Transplant, 1993. **12**(2): p. 121-4.
93. Schmidt, A. and M.H. Wolff, *Morphological characteristics of Aspergillus fumigatus strains isolated from patient samples*. Mycoses, 1997. **40**(9-10): p. 347-51.

94. Schubert, M.S., *Allergic fungal sinusitis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2006. **30**(3): p. 205-16.
95. Seebacher, C., J.P. Bouchara, and B. Mignon, *Updates on the epidemiology of dermatophyte infections*. Mycopathologia, 2008. **166**(5-6): p. 335-52.
96. Seifert, H., U. Aurbach, D. Stefanik, and O. Cornely, *In vitro activities of isavuconazole and other antifungal agents against Candida bloodstream isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(5): p. 1818-21.
97. Singh, N. and D.L. Paterson, *Aspergillus infections in transplant recipients*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(1): p. 44-69.
98. Singh, O.V. and R. Kumar, *Biotechnological production of gluconic acid: future implications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **75**(4): p. 713-22.
99. Singhal, P., K. Usuda, and A.C. Mehta, *Post-lung transplantation Aspergillus niger infection*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(9): p. 1446-7.
100. Sitte, P., E.W. Weiler, J.W. Kadereit, A. Bresinsky, and C. Körner, *Strasburger - Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 35. Auflage ed. 2002, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
101. Steinbach, W.J., D.K. Benjamin, Jr., D.P. Kontoyiannis, J.R. Perfect, I. Lutsar, K.A. Marr, M.S. Lionakis, H.A. Torres, H. Jafri, and T.J. Walsh, *Infections due to Aspergillus terreus: a multicenter retrospective analysis of 83 cases*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(2): p. 192-8.
102. Streifel, A.J., J.L. Lauer, D. Vesley, B. Juni, and F.S. Rhame, *Aspergillus fumigatus and other thermotolerant fungi generated by hospital building demolition*. Appl Environ Microbiol, 1983. **46**(2): p. 375-8.
103. Sturtevant, J. and J.P. Latge, *Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of Aspergillus fumigatus by human polymorphonuclear cells*. J Infect Dis, 1992. **166**(3): p. 580-6.
104. Sutton, D.A., S.E. Sanche, S.G. Revankar, A.W. Fothergill, and M.G. Rinaldi, *In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of Aspergillus terreus, with a head-to-head comparison to voriconazole*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(7): p. 2343-5.
105. Tronchin, G., K. Esnault, G. Renier, R. Filmon, D. Chabasse, and J.P. Bouchara, *Expression and identification of a laminin-binding protein in Aspergillus fumigatus conidia*. Infect Immun, 1997. **65**(1): p. 9-15.
106. Vehreschild, J.J., A. Bohme, D. Reichert, M.G. Kiehl, D. Arenz, K. Pankraz, M. Kochanek, A.J. Ullmann, and O.A. Cornely, *Treatment of invasive fungal infections in clinical practice: a multi-centre survey on customary dosing, treatment indications, efficacy and safety of voriconazole*. Int J Hematol, 2008. **87**(2): p. 126-31.
107. Vincken, W., W. Schandevul, and P. Roels, *Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by Aspergillus terreus*. Am Rev Respir Dis, 1983. **127**(3): p. 388-9.
108. Warnock, D.W., *Trends in the epidemiology of invasive fungal infections*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 2007. **48**(1): p. 1-12.
109. Wetterstation-Köln-Neu-Ehrenfeld. [cited zuletzt aufgerufen am 26.11.2008]; Available from: <http://home.arcor.de/johannes12/Wetter.htm>.
110. Wikipedia. *Jahreszeit*. 2009 20.05.2009 [cited; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Jahreszeit> (zuletzt aufgerufen am 23. Mai 2009).
111. Wikipedia. *Temperatur*. 2009 [cited; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Temperatur> (zuletzt aufgerufen am 23.11.2009).
112. Wikipedia. *Luftfeuchtigkeit*. 2009 15.05.2009 [cited; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Luftfeuchte> (zuletzt aufgerufen am 23. Mai 2009).
113. Wikipedia. *Taupunkt*. 2009 20.05.2009 [cited; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Taupunkt> (zuletzt aufgerufen am 23. Mai 2009).
114. Wikipedia. *Luftdruck*. 2009 19.04.2009 [cited; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Luftdruck#Meteorologie> (zuletzt aufgerufen am 23. Mai 2009).
115. Wikipedia. *Echinocandine*. 2009 4.10.2009 [cited; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Echinocandin> (zuletzt aufgerufen am 16.11.2009).

116. Willinger, B., *Die wichtigsten Pilze in Wort und Bild - Eine Anleitung zur Identifizierung*
von Hefen und Fadenpilzen

8. Vorabveröffentlichungen

8.1 Beiträge zu wissenschaftlichen Kongressen (Abstracts und Poster)

S. Gerlach, J. J. Vehreschild, M. J. G. T. Rüping, P. Hartmann, C. Lass-Flörl, K. Grif, G. Fischer, O. A. Cornely "*Epidemiology of Aspergillus terreus at the University Hospital of Cologne: molecular typing of environmental and clinical isolates – a measure for quality management*" Jahrestagung der Deutschen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG) 04.-06. September 2008, Jena, Deutschland

S. Gerlach, J. J. Vehreschild, M. J. G. T. Rüping, P. Hartmann, C. Lass-Flörl, K. Grif, G. Fischer, O. A. Cornely "*Epidemiology of Aspergillus terreus at the University Hospital of Cologne*" Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), 10.-14. Oktober 2008, Wien, Österreich

S. Gerlach, J. J. Vehreschild, M. J. G. T. Rüping, P. Hartmann, C. Lass-Flörl, K. Grif, G. Fischer, O. A. Cornely "*Epidemiology of Aspergillus spp. at the University Hospital of Cologne*" Jahrestagung der Deutschen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG) 03.-05. September 2009, Köln, Deutschland

S. Gerlach, J. J. Vehreschild, M. J. G. T. Rüping, P. Hartmann, C. Lass-Flörl, K. Grif, G. Fischer, O. A. Cornely "*Epidemiology of Aspergillus spp. at the University Hospital of Cologne*" Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 12.-15. September 2009, San Francisco, USA

S. Gerlach, J. J. Vehreschild, M. J. G. T. Rüping, P. Hartmann, C. Lass-Flörl, K. Grif, G. Fischer, O. A. Cornely "*Epidemiology of Aspergillus terreus at the University Hospital of Cologne*" Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), 02.-06. Oktober 2009, Mannheim, Deutschland

S. Gerlach, J. J. Vehreschild, M. J. G. T. Rüping, P. Hartmann, C. Lass-Flörl, K. Grif, G. Fischer, O. A. Cornely "*One Year Aspergillus spp. Surveillance Study at the University Hospital of Cologne*" Kongress der Trends in Medical Mycology (TIMM), 18.-21. Oktober 2009, Athen, Griechenland

S. Gerlach, J. J. Vehreschild, M. J. G. T. Rüping, P. Hartmann, C. Lass-Flörl, K. Grif, G. Fischer, O. A. Cornely "*The Role of Aspergillus terreus at the University Hospital of Cologne*" Tagung der Advances Against Aspergillosis (AAA), 04.-06. Februar 2010, Rom, Italien

8.2 Vorträge

M. J. G. T. Rüping, S. Gerlach, C. Lass-Flörl, G. Fischer, O. A. Cornely "Korrelation des Auftretens von Erregern zwischen Umwelt und Körper?" Jahrestagung der Deutschen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG) 03.-05. September 2009, Köln, Deutschland

9. Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.