

Evaluation of *Aspergillus* PCR protocols for testing serum specimens.

White PL, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Barnes RA, Donnelly JP, Loeffler J; European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI). J Clin Microbiol. 2011 Nov;49(11):3842-8.

Einleitung

Die *Aspergillus*-PCR wird für das Screening eingesetzt, um eine invasive Aspergillose (IA) möglichst auszuschliessen. Dazu ist regelmässiges Sampling von Blut erforderlich.

Im Gegensatz dazu werden beim Verdacht einer IA invasive Probenmaterialien wie Biopsien oder allenfalls BAL zum mikrobiologischen Nachweis verwendet.

Die European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI) wurde gegründet, um den PCR-Nachweis aus Blut zu standardisieren und hat kürzlich Resultate zur Untersuchung von Vollblut publiziert. Die Aufarbeitung von Vollblut ist technisch anspruchsvoll und bisher kaum standardisiert.

Die Untersuchung von Serum oder Plasma aber ist einfach durchzuführen und wurde in verschiedenen Studien erfolgreich durchgeführt. Die Sensitivität, resp. Spezifität betrug bei diesen Arbeiten insgesamt 72%, resp. 96.5%.

In dieser Studie werden die Resultate zum Nachweis von Aspergillen-DNA aus Serum anhand eines Panels von 10 Proben, die an 23 Zentren verschickt wurden, aufgezeigt und aufgrund der statistischen Auswertungen Empfehlungen zur Verbesserung der Protokolle formuliert.

Material und Methoden

Teilnehmende

Insgesamt 23 Labors: 8 Hauptlaboratorien und 15 weitere Zentren aus Europa, USA und Australien

Panel

bestehend aus 10 Serumproben: 8 mit *Aspergillus fumigatus* DNA-gespikte Proben, 2 Negativ-Kontrollen.

Die Nachweisgrenze von 10 Genomequivalent/ml sollte in allen Labors erreicht werden.

In zwei Proben werden Konzentrationen unter diesem Grenzwert (5 und 1 Genomequivalent/ml) geliefert. Siehe Tabelle 1.

Protokolle

15 verschiedene Extraktionsprotokolle und 22 verschiedene PCR Protokolle (Ziel-Gen, Volumen Extrakt für PCR, PCR Plattform etc.) wurden durchgeführt und im Detail berichtet.

Datenanalyse

Quantifizierung aufgrund des Ct-Wertes und der Aspergillen-DNA-Menge. Ct-Wert > 45 wurde als negativ gewertet.

Statistische Auswertung, um den Einfluss der verschiedenen Parameter wie z.B. Volumen Extrakt für PCR (Kovarianten) zu messen.

Resultate

- 22 von 23 angeschriebenen Labor lieferten Resultate. 1 Zentrum verwendete nested PCR und wurde ausgeschlossen.
- Es wurden 29 Protokolle verwendet: 2 Zentren benutzten 3 Protokolle und 2 Zentren 2 verschiedenen P.
- siehe Tabelle 2.
- 24 der 29 Protokolle konnten den geforderten Wert von 10 Ge/ml detektieren.

Die Gesamt-Sensitivität betrug 86.1%, die Gesamt-Spezifität 93.6%.

Einfluss der Protokollparameter auf Resultat (siehe Tabelle 4):

Positiver Effekt:

- Probenvolumen
- interne Kontrolle
- PCR Zielgen: ITS Region

Negativer Effekt:

- Elutionsvolumen
- PCR Zielgen: Mitochondriale DNA

Diskussion

- Zielmolekül bei der Untersuchung von Serum ist frei zirkulierende DNA (DNAämie).
- Die Extraktion der Proben ist daher recht einfach durchzuführen.
- In 5 von 29 Protokollen wurde der analytische Grenzwert nicht erreicht: Identifikation der kritischen Teilverfahren und entsprechende Modifikation.
 - Falschpositive Resultate waren relativ selten: Identifikation der Quelle, ev. PCR Reagenzien kontaminiert.
 - Die Gesamt-Sensitivität und -Spezifität (86.1%, 93.6%) ist in hoher Übereinstimmung mit den Daten aus Vollblut, die mit den EAPCRI Richtlinien erhoben wurden (88.7%, 91.6%).
- Aufgrund der Resultate zum Einfluss der verschiedenen Protokollparameter werden Empfehlungen formuliert (**siehe Tabelle 5**).

Schlüsse

Das Testen von Serum mit der *Aspergillus*-PCR kann verlässlich mit kommerziellen DNA-Extraktionsverfahren durchgeführt werden.

Die Analyse von Serum ist gegenüber Vollblut technisch einfacher und auch rascher durchführbar.

Es wird nur eine Probe benötigt, um Galactomannan, beta-D-Gucan und PCR durchzuführen.

Das klinisch relevante Target für eine IA in Blut (bei Vollblut Pilzzellen-assoziierte DNA oder bei Serum frei zirkulierende DNA) muss mit weiteren Studien identifiziert werden, um folglich das optimale Probematerial einzusetzen.

15.12.2011/DG