



Chapter 8

Nederlandse samenvatting



INTRODUCTIE

Invasieve aspergillose is een levensbedreigende opportunistische schimmelinfectie. Dit betekent dat deze infectie in principe voorkomt bij patiënten met een langdurig ernstig verlaagde weerstand en niet bij mensen met een normale weerstand. De ziekte wordt veroorzaakt door de schimmel *Aspergillus*. Er zijn verschillende *Aspergillus* soorten, maar de meest voorkomende verwekker voor invasieve aspergillose is de *Aspergillus fumigatus*. *Aspergillus fumigatus* is alom aanwezig in het milieu en wordt door mensen ingeademd. Bij gezonde mensen ruimt het immuunsysteem de *Aspergillus fumigatus* op. Bij patiënten met een langdurig verlaagde weerstand kan de *Aspergillus fumigatus* zich ontwikkelen tot een invasieve infectie waarbij weefsels en organen worden aangetast. Omdat *Aspergillus fumigatus* wordt ingeademd, zijn de longen het vaakst betrokken bij invasieve aspergillose. De infectie kan echter ook voorkomen in andere organen zoals de hersenen en de darmen.

Het vaststellen van de diagnose invasieve aspergillose kan moeilijk zijn en gebeurt vaak met behulp van de gereviseerde criteria van de European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Infectious Diseases Study Mycoses Group (EORTC/MSG). Hierbij wordt de het voorkomen van de schimmelziekte aangegeven met 'bewezen', 'waarschijnlijk' of 'mogelijk'. Bewezen invasieve aspergillose betekent dat er sprake is van een weefselbiopsie met tekenen van een schimmelinfectie of dat *Aspergillus* groeit uit een kweek welke is afgenomen van steriel lichaamsmateriaal. Het is echter vaak niet mogelijk om een invasieve aspergillose te bewijzen vanwege de risico's op complicaties bij het afnemen van een biopsie of omdat de patiënt te ziek is om een biopsie te ondergaan. Daarom wordt de diagnose meestal indirect gesteld door middel van de criteria van 'waarschijnlijke' of 'mogelijke' invasieve aspergillose. Een 'waarschijnlijke' invasieve aspergillose bestaat uit drie verschillende criteria waaraan moet zijn voldaan: een vatbare patiënt, een klinisch criterium en een microbiologisch criterium. Een vatbare patiënt omvat een patiënt die een langdurig verlaagde weerstand heeft op basis van neutropenie (lage aantal van bepaald soort witte bloedcellen), immunosuppressiva (medicijnen die de weerstand verlagen) of een stamceltransplantatie. De klinische criteria omvatten o.a. specifieke afwijkingen in de longen, zoals de aanwezigheid van ronde afwijkingen met een halo- of crescent-teken. De microbiologische criteria bestaan uit het aantonen van antistoffen tegen componenten van de *Aspergillus* celwand (galactomannan of Beta-(1,3)-d-glucan) of het kweken van *Aspergillus* uit niet steriel materiaal. Wanneer een patiënt voldoet aan één van elk van de patiënt, klinische en microbiologische criteria, dan is er sprake van een 'waarschijnlijke' invasieve aspergillose. Wanneer een patiënt alleen voldoet aan de patiënt en klinische criteria, dan wordt er gesproken van een 'mogelijke' invasieve aspergillose. Zoals de benaming het aangeeft, hangt de zekerheid van de diagnose af van het aantal aanwezige criteria. De EORTC/

MSG criteria zijn opgesteld voor onderzoeksdoeleinden, maar worden in de kliniek ook gebruikt. Echter, zij omvatten niet alle patiënten die invasieve aspergillose hebben. Vatbare patiënten met een microbiologisch criterium, maar zonder een klinisch criterium, beschouwt men vaak toch als invasieve aspergillose hebbende. Deze patiënten worden ook zodanig behandeld, omdat onderzoek heeft aangetoond dat zij dezelfde complicaties en mortaliteit hebben als patiënten met een 'waarschijnlijke' invasieve aspergillose. Deze categorie bestaat niet in de EORTC/MSG criteria, maar wordt in dit proefschrift omschreven als 'non-classifiable' invasieve aspergillose.

Zoals eerder beschreven, hebben patiënten met een langdurig ernstig verlaagde weerstand een risico op het ontwikkelen van invasieve aspergillose. Eén van de vatbare patiëntengroepen zijn patiënten met een onderliggende hematologische ziekten (bloedziekten), die een langdurig verlaagde weerstand ontwikkelen door hun onderliggende ziekte (bijvoorbeeld acute leukemie) of door hun behandeling (intensieve chemotherapie of stamceltransplantatie). 2,3% tot 24% van de patiënten met acute leukemie of patiënten die een stamceltransplantatie hebben ondergaan, ontwikkelen een invasieve aspergillose. Een gedeelte van deze patiënten overlijdt aan de infectie. De eerstelijnsbehandeling bestaat uit voriconazol of posaconazol, welke medicijnen zijn uit de groep 'azolen'. Wanneer de diagnose invasieve aspergillose snel wordt gesteld en de behandeling met azolen direct wordt gestart, dan is de kans op overlijden relatief laag. Het is daarom belangrijk om de diagnose zo spoedig mogelijk te stellen, zodat adequate behandeling zonder vertraging gestart wordt.

In dit proefschrift is er gekeken naar de incidentie, mortaliteit en risicofactoren van invasieve aspergillose in patiënten met een onderliggende hematologische ziekte. Daarnaast werden nieuwe methoden om invasieve aspergillose te detecteren onderzocht.

INVASIEVE ASPERGILLOSE EN ALLOGENE STAMCELTRANSPLANTATIE

Een gedeelte van de patiënten met een onderliggende hematologische maligniteit wordt behandeld met een allogene stamceltransplantatie. Dit betekent dat er een transplantatie plaatsvindt met stamcellen van een geschikte donor. Deze donor kan een familielid of onbekende persoon zijn, of zelfs navelstrengbloed van pasgeborenen. Stamcellen bevinden zich normaliter in het beenmerg en ontwikkelen zich tot verschillende bloedcellen, zoals rode bloedcellen, witte bloedcellen en bloedplaatjes. Een allogene stamceltransplantatie zorgt niet alleen voor het herstel van de verschillende bloedcellen, maar helpt tevens in het behandelen van de onderliggende hematologische ziekte (Graft-versus-Disease effect). Patiënten die een allogene stamceltransplantatie ondergaan, hebben een langdurig verlaagde weerstand na de stamceltransplantatie. Enerzijds moet de weerstand opnieuw opgebouwd uit de donor stamcellen, anderzijds

is de weerstand verlaagd door medicijnen. Dit laatste is nodig omdat de witte bloedcellen van de donor ook tegen weefsels en organen van de patiënt kunnen keren, hetgeen omgekeerde afstotingsreactie oftewel Graft-versus-Host Disease wordt genoemd. Een medicijn dat veel wordt gebruikt voor de behandeling van Graft-versus-Host Disease, zijn corticosteroïden. Patiënten met een allogene stamceltransplantatie hebben een verhoogd risico op het ontwikkelen van invasieve aspergillose.

Het Erasmus Medisch Centrum heeft een grote afdeling hematologie waar allogene stamceltransplantaties plaatsvinden. In hoofdstuk 2 wordt een onderzoek beschreven waarin gekeken werd naar invasieve aspergillose bij patiënten die een allogene stamceltransplantatie hebben ondergaan in de periode van 2004 t/m 2014. Het doel van dit onderzoek was om naar de incidentie, mortaliteit en risicofactoren van invasieve aspergillose te kijken. In totaal kregen 663 patiënten een allogene stamceltransplantatie. Twaalf maanden na transplantatie hadden 86 van de 663 patiënten invasieve aspergillose ontwikkeld (1.8% bewezen, 7.4% waarschijnlijk en 3.8% non-classifiable invasieve aspergillose). De mortaliteit op 12 maanden was 14% hoger in patiënten met invasieve aspergillose in vergelijking met patiënten zonder invasieve aspergillose (40% versus 26%; p-waarde <0.01). Het bepalen van de risicofactoren werd gedaan door middel van een case-control onderzoek, waarbij de karakteristieken van patiënten met een invasieve aspergillose (case) vergeleken werden met patiënten zonder invasieve aspergillose (control). Er werden 99 case patiënten gepaard met 198 control patiënten op basis van leeftijd, jaar van stamceltransplantatie en duur van follow-up. De volgende risicofactoren werden gevonden: een verminderd aantal van neutrofiële granulocyten en lymfocyten (allebei zijn witte bloedcellen), een verminderde longfunctie voorafgaand aan de allogene stamceltransplantatie, een verminderde functie van de nieren, het reactiveren van cytomegalovirus en het gebruik van corticosteroïden bij de behandeling van Graft-versus-Host Disease. Een hogere dosis corticosteroïden werd geassocieerd met een hogere kans om invasieve aspergillose te ontwikkelen. Naar aanleiding van de resultaten uit dit onderzoek is het beleid aangepast betreffende de preventie van invasieve aspergillose. Patiënten die behandeld worden met een hoge dosis corticosteroïden krijgen nu ook therapie met azolen ter voorkoming van invasieve aspergillose.

INHALATIE VAN LIPOSOMAAL AMFOTERICINE-B TER VOORKOMING VAN INVASIEVE ASPERGILLOSE

Patiënten die een acute myeloïde leukemie hebben, worden behandeld met intensieve chemotherapie. Zij hebben enkele weken geen tot zeer lage aantallen van afweercellen na de chemotherapie. In deze periode zijn patiënten zeer vatbaar voor allerlei verschillende infectieziekten, waaronder invasieve aspergillose. In 2008 liet een onderzoek zien

dat het inhaleren van liposomaal amfotericine-B (L-AmB) de incidentie van invasieve aspergillose verlaagd van 14% naar 4%. L-AmB is een medicijn tegen invasieve aspergillose. In het onderzoek inhaleerden patiënten L-AmB 2x per week. Naar aanleiding van de bovenstaande resultaten wordt L-AmB inhalatie standaard voorgeschreven aan patiënten met acute myeloïde leukemie die intensieve chemotherapie ondergaan in het Erasmus Medisch Centrum. Hoofdstuk 3 beschrijft een prospectief onderzoek waarin we hebben gekeken naar de effectiviteit en kosten-baten van L-AmB inhalatie in patiënten met acute myeloïde leukemie, die behandeld werden met intensieve chemotherapie. In de periode van 2008 t/m 2012 waren er 127 patiënten die L-AmB hadden geïnhaaleerd gedurende hun eerste en tweede chemotherapie. Deze 127 patiënten werden vergeleken met 108 historische controle patiënten die waren behandeld voor acute myeloïde leukemie in de periode van 2005 t/m 2008. De controle patiënten hadden geen L-AmB geïnhaaleerd. Er werd een significante daling in de incidentie van bewezen en waarschijnlijke invasieve aspergillose gezien in de patiënten die L-AmB hadden geïnhaaleerd (L-AmB groep 9,5% versus controle groep 34,4%; p-waarde=0,0064). Er werden geen ernstige bijwerkingen van de L-AmB inhalatie waargenomen. Daarnaast werden de kosten voor L-AmB en de bijbehorende apparatuur voor inhalatie ruimschoots gecompenseerd (1292 euro per patiënt) door de verminderde kosten in diagnostiek en gebruik van voriconazol (-1816 euro per patiënt). Concluderend was de inhalatie van L-AmB effectief ter voorkoming van invasieve aspergillose en daarbij ook kosteneffectief.

GALACTOMANNAN ANTIGEENTEST IN CEREBROSPINAAL VLOEISTOF

Invasieve aspergillose komt meestal voor in de longen, maar kan ook voorkomen in andere organen. Wanneer invasieve aspergillose in de hersenen voorkomt, wordt dit cerebrale aspergillose genoemd. Cerebrale aspergillose is zeldzaam en gaat gepaard met een zeer slechte overleving. De diagnose kan moeizaam zijn doordat het beeldvormend onderzoek van de hersenen niet specifiek is en *Aspergillus* in de hersenvloeistof slechts gekweekt wordt in minder dan een derde van de patiënten. Om de diagnose met zekerheid te stellen dient er een hersenbiopsie afgenomen te worden. Dit is echter vaak niet mogelijk bij patiënten met een onderliggende hematologische ziekte vanwege potentiële complicaties of ernstig ziek zijn. Daarentegen is het vaak wel mogelijk om hersenvloeistof af te nemen middels een lumbaalpunctie. *Aspergillus* kan indirect worden aangetoond door de bepaling van antigenen tegen galactomannan, een celwand component welke vrijkomt tijdens de groei van *Aspergillus*. De galactomannan antigeentest behoort tot de microbiologische criteria van de EORTC/MSG criteria en kan op verschillende lichaamsmaterialen bepaald worden. De test is uitgebreid onderzocht op longvloeistof en bloed, maar er is weinig onderzoek verricht naar de bruikbaarheid

van deze test op hersenvloeistof. Hoofdstuk 4 beschrijft een onderzoek over de bruikbaarheid van de galactomannan antigeentest op hersenvloeistof. Alle patiënten van het Erasmus Medisch Centrum en Universitair Ziekenhuis Leuven werden geïnccludeerd bij wie een galactomannan antigeentest op de hersenvloeistof was bepaald in de periode van 2004 t/m 2014. De EORTC/MSG criteria werden gebruikt om de diagnose bewezen of waarschijnlijke cerebrale aspergillose te stellen. Omdat de galactomannan antigeentest op hersenvloeistof werd onderzocht, werd deze geëxcludeerd van de microbiologische criteria. De galactomannan antigeentest was uitgevoerd op 205 hersenvloeistoffen van 157 patiënten. Bij een groot gedeelte van de patiënten waren de gegevens onvolledig. Deze patiënten werden daarom geëxcludeerd. Na exclusie bleven er 44 patiënten over, waarvan 4 patiënten met een bewezen cerebrale aspergillose, 13 patiënten met een waarschijnlijke cerebrale aspergillose en 27 patiënten zonder cerebrale aspergillose. Van de 17 patiënten met een cerebrale aspergillose hadden 15 patiënten een galactomannan antigeentest met een waarde van 2,0 of hoger. Van de patiënten zonder cerebrale aspergillose, hadden 26 van de 27 patiënten een galactomannan antigeentest van 0,5 of lager, en 1 patiënt een galactomannan antigeentest van 8,2. Wanneer een galactomannan cutoff waarde van 1,0 werd genomen, was de sensitiviteit 88,2% en de specificiteit 96,3%. We vonden dezelfde resultaten bij een cutoff waarde van 0,5 of 2,0. Concluderend heeft de galactomannan antigeentest een goede diagnostische waarde en kan de test gebruikt worden voor het aantonen of uitsluiten van cerebrale aspergillose.

AZOL-RESISTENTE *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Azolen zijn de eerstelijnsbehandeling voor invasieve aspergillose. In de afgelopen 15 jaar is er sprake van een toenemende resistentie voor azolen. Deze azoolresistentie is ontstaan door overvloedig gebruik van azolen in de landbouw ter bescherming van de gewassen tegen schimmelinfecties. De agrarische azolen zijn qua chemische structuur vergelijkbaar met medische azolen, waardoor er kruisresistentie is ontstaan. Dit is een groot probleem, want onderzoek toont aan dat patiënten die geïnfecteerd zijn met een azoolresistente *Aspergillus fumigatus*, een zeer hoge mortaliteit van bijna 90% hebben. Azolen zijn bewezen superieur in de behandeling voor invasieve aspergillose ten opzichte van andere medicijnen als amfotericine-B en echinocandinen. Bovendien zijn azolen het enige anti-schimmel medicijn dat oraal gegeven kan worden, hetgeen van belang is omdat patiënten vaak langdurig behandeld moeten worden. Naast het probleem van therapie is de detectie van de azoolresistente *Aspergillus fumigatus* een uitdaging. Een gevoeligheidsbepaling naar anti-schimmel medicatie is mogelijk wanneer *Aspergillus* gekweekt is. *Aspergillus fumigatus* wordt echter in klein gedeelte van de patiënten gekweekt, waardoor een gevoeligheidsbepaling vaak niet mogelijk. Als

de *Aspergillus* wel wordt gekweekt, duurt het lang alvorens de gevoeligheidsbepaling bekend is. Dit komt omdat enerzijds de gevoeligheidsbepaling meestal gebeurt in een referentielaboratorium en anderzijds de *Aspergillus* langzaam groeit.

Het grootste gedeelte van de azoolresistentie wordt veroorzaakt door mutaties in het *Cyp51A* gen van de *Aspergillus fumigatus*. Het *Cyp51A* gen codeert voor het lanestrol 14- α -demethylase, een belangrijk enzym welke betrokken is in de bouw van de *Aspergillus* celwand. Dit enzym is tevens het aangrijpingspunt voor azolen. Mutaties in het *Cyp51A* gen kunnen zorgen voor azoolresistentie. Azoolresistentie in Nederland wordt voor bijna voor 90% veroorzaakt door twee mutatie combinaties in het *Cyp51A* gen: TR₃₄/L98H en TR₄₆/T298A/Y121F. Wanneer één van deze mutatie combinaties gevonden wordt, is er sprake van pan-azoolresistentie. Pan-azoolresistentie betekent dat er resistentie is tegen alle soorten azolen. Indien de twee mutatie combinaties snel aangetoond kunnen worden, is het mogelijk om een patiënt adequater te behandelen door het starten van een andere anti-schimmel therapie dan azolen.

Het aantonen van gen kan gebeuren door middel van een polymerase-kettingreactie (polymerase chain reaction: PCR). De PCR is een moleculaire techniek waarbij snel en eenvoudig specifieke stukken DNA vermenigvuldigd kunnen worden. Een multiplex-PCR is een PCR waarbij meerdere PCR producten tegelijkertijd aangemaakt worden. Idealiter zou een PCR voor het aantonen van *Aspergillus* DNA moeten voldoen aan twee voorwaarden: i) het aantonen van *Aspergillus* DNA direct op lichaamsmateriaal, ook wanneer er geen *Aspergillus* gekweekt wordt op datzelfde materiaal, en ii) het tevens aantonen van de meest voorkomende mutatie combinaties in het *Cyp51A* gen. Een dergelijke PCR is de AsperGenius® multiplex real-time PCR welke ontwikkeld werd door PathoNostics, een bedrijf in Maastricht. Deze commerciële PCR bestaat uit twee delen: de species PCR en de resistentie PCR. De species PCR toont de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* en *Aspergillus* species aan. De resistentie PCR toont de mutaties TR₃₄, L98H, T298A en Y121F mutaties in het *Cyp51A* gen welke correleren met de twee meest voorkomende mutatie combinaties TR₃₄/L98H en TR₄₆/T298A/Y121F. In hoofdstuk 5 worden twee onderzoeken beschreven over de diagnostische waarde van de AsperGenius® PCR op broncho-alveolar lavage (BAL). Een BAL is vloeistof dat is verkregen na spoeling van de longen met water door middel van een bronchoscopie (longonderzoek). Dit longvloeistof wordt gebruikt voor een kweek en de bepaling van het galactomannan antigeentest. Hoofdstuk 5.1 beschrijft het eerste onderzoek waarbij de AsperGenius® PCR werd getest op 37 longvloeistoffen van patiënten met een onderliggende hematologische ziekte en 40 vloeistoffen van patiënten van de intensive care. Het onderzoek werd verricht in het Erasmus Medisch Centrum. De uitslagen van de AsperGenius® PCR werden vergeleken met de uitslagen van galactomannan antigeentesten en kweken welke eerder waren uitgevoerd op de longvloeistoffen. De positieve controles waren de longvloeistoffen met een galactomannan van $\geq 1,0$ en/of een positieve *Aspergillus*

kweek. De negatieve controles waren de longvloeistoffen met een negatieve uitslag voor de galactomannan antigeentest en *Aspergillus* kweek. Tweeëntwintig van de 77 longvloeistoffen waren afkomstig van patiënten met invasieve aspergillose (2 bewezen, 9 waarschijnlijk en 11 non-classifiable). Negentien van de 22 longvloeistoffen waren positieve controles. Negen longvloeistoffen hadden een positieve *Aspergillus* kweek. Er werd gekeken naar de optimale cyclic threshold van de PCR. De cyclic threshold is het aantal vermenigvuldigingen die nodig zijn om een echt signaal te vinden dat *Aspergillus* aan te tonen. De optimale cyclic threshold waarde werd gevonden bij <36. Zestien van de 19 longvloeistoffen hadden een positieve species PCR, waarbij er 2 *Aspergillus* species en 14 *Aspergillus fumigatus* werden gevonden. Dit resulteerde in een sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief voorspellende waarde van 88.9%, 89.3%, 72.7% en 96.2% in de hematologie groep en 80.0%, 93.3%, 80.0% en 93.3% in de intensive care groep. De resistentie PCR werd verricht op de 14 longvloeistoffen waar een *Aspergillus fumigatus* was gevonden. De resistentie PCR vond twaalf wildtypes (oftwel *Aspergillus fumigatus* zonder *Cyp51A* mutaties TR₃₄, L98H, T298A en Y121F welke meest waarschijnlijk gevoelig zijn voor azolen) en twee mutanten (één met TR₃₄/L98H en één met TR₄₆/Y121F/T289A). De twee longvloeistoffen met een *Aspergillus fumigatus* met mutaties waren afkomstig van patiënten die gefaald hadden op azooltherapie. Samenvattend had de geteste PCR een goede diagnostische waarde en was het mogelijk om de PCR te gebruiken op longvloeistoffen welke geen positieve *Aspergillus* kweek hadden. Daarbij kon de PCR *Cyp51A* mutaties in de *Aspergillus fumigatus* aantonen, welke gerelateerd zijn met azoolresistentie.

Het single-center onderzoek van hoofdstuk 5.1 is vervolgd door een tweede onderzoek. Hoofdstuk 5.2 beschrijft het vervolgonderzoek over de AsperGenius® PCR waarin vijf ziekenhuizen in Nederland en België deelnamen. In dit multicenter onderzoek waren de doelen: i) het bevestigen van de optimale cyclic threshold en diagnostische waarde van de PCR op longvloeistoffen, en ii) het onderzoeken of de aanwezigheid van resistentie geassocieerde mutaties (RAM) gerelateerd is met het falen van de behandeling met azolen of de mortaliteit op 6 weken na diagnose van invasieve aspergillose. Er waren 201 patiënten van wie een longvloeistof beschikbaar was. Achtentachtig van 201 longvloeistoffen waren positieve controles en 113 waren negatieve controles. De optimale cyclic threshold werd onderzocht middels twee verschillende methoden: de closest to (0,1) en de Youden index. Deze twee methoden gaven respectievelijk een cutoff van <38 en <36 aan als beste cyclic threshold. We kozen de cyclic threshold van <38 aan als optimale cutoff, omdat deze gepaard gaat met een hogere sensitiviteit. Het missen van de diagnose invasieve aspergillose heeft namelijk grote negatieve gevolgen voor een patiënt. Met een cyclic threshold cutoff van <38, hadden 74 van de 88 positieve controles een uitslag van de species PCR. Van deze 74 longvloeistoffen waren er bij 32 longvloeistoffen geen *Aspergillus* gekweekt. De sensitiviteit, specificiteit, positieve en

negatieve voorspellende waarden waren respectievelijk 84%, 80%, 76% and 87% bij een cyclic threshold cutoff van <38 . Voor het bepalen van therapiefalen met azolen en mortaliteit op 6 weken werden de data van het eerste single-center onderzoek en het huidige onderzoek bij elkaar gevoegd. Dit werd gedaan omdat azoolresistentie nog relatief weinig voorkomt. In totaal waren er 78 patiënten die geïnfecteerd waren met wildtype *Aspergillus fumigatus* (n=65) of een *Aspergillus fumigatus* met RAMs (n=13). Vijventwintig van de 78 patiënten werden geëxcludeerd, omdat zij niet aan de vooraf opgestelde voorwaarden voldeden. Na de exclusie bleven er 53 patiënten over, waarvan 45 met een wildtype *Aspergillus fumigatus* en 8 met *Aspergillus fumigatus* met RAMs (6 TR₃₄/L98H en 2 met TR₄₆/Y121F/T289A). Het falen van azooltherapie werd gezien in 12 van de 45 patiënten met een wildtype *Aspergillus fumigatus* versus 6 van de 8 patiënten met *Aspergillus fumigatus* met RAMs (p-waarde = 0,01). De mortaliteit op 6 weken was 2,7 keer hoger in patiënten met een *Aspergillus fumigatus* met RAMs (18,6% zonder RAMs versus 50,0% met RAMs, p-waarde = 0,07). Hiermee werd voor het eerst beschreven dat er een associatie is tussen het falen van azooltherapie en het geïnfecteerd zijn met een *Aspergillus fumigatus* met RAMs.

ONDERSCHIEDING VAN *ASPERGILLUS FUMIGATUS*, *ASPERGILLUS LENTULUS* EN *ASPERGILLUS FELIS*

Er bestaan verschillende soorten *Aspergilli*. De *Aspergillus fumigatus* behoort tot de sectie *Fumigati* binnen de *Aspergilli*. De *Aspergilli* in de sectie *Fumigati* kunnen qua morfologie (uiterlijk) op elkaar lijken, waardoor onderscheiding alleen mogelijk is op basis van moleculaire technieken. Het onderscheid tussen verschillende *Aspergilli* binnen de sectie *Fumigati* is belangrijk, omdat sommigen intrinsiek resistent zijn voor azolen. Intrinsieke resistentie betekent dat deze resistentie een stabiel genetisch eigenschap is en gecodeerd is in het DNA. Dit in tegenstelling tot verworven resistentie, welke verworven kan worden door bijvoorbeeld mutaties in het DNA. Tot op heden omvat de sectie *Fumigati* 63 species, waarvan er 17 beschreven zijn die invasieve aspergillose kunnen veroorzaken bij mensen en/of zoogdieren. Twee van deze beschreven *Aspergilli* zijn de *Aspergillus lentulus* en *Aspergillus felis*. Beiden zijn intrinsiek resistent voor azolen en worden sporadisch gerapporteerd als verwekkers van invasieve aspergillose.

In hoofdstuk 6 beschrijven wij twee patiënten die een bewezen invasieve aspergillose hadden ontwikkeld met respectievelijk een *Aspergillus lentulus* en *Aspergillus felis*. Deze twee *Aspergilli* waren gekweekt uit een bipt en identificatie werd verricht middels moleculaire technieken. De AsperGenius® PCR werd getest op deze twee *Aspergilli* en extra controle stammen van *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus lentulus* en *Aspergillus felis*. We onderzochten of de PCR deze drie *Aspergilli* kon onderscheiden, omdat *Aspergillus*

fumigatus meestal azoolgevoelig is en de *Aspergillus lentulus* en *Aspergillus felis* daarentegen juist azoolresistent zijn. Indien er geen onderscheid gemaakt kan worden, zou dit kunnen leiden tot een inadequate behandeling van een patiënt die geïnfecteerd is met een *Aspergillus lentulus* of *Aspergillus felis*.

De AsperGenius® resistentie PCR toonde variabele smeltpunten voor de drie verschillende *Aspergilli*, maar kon geen onderscheid maken. De PCR detecteerde geen TR₃₄ marker in de *Aspergillus lentulus* en *Aspergillus felis*. Dit was in tegenstelling tot de *Aspergillus fumigatus* waarin de TR₃₄ kon worden aangetoond zowel in een wildtype als mutant. Daarnaast waren de smeltpunten van de L98H en Y121F markers verschillend tussen *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus lentulus* en *Aspergillus felis*. Met name de Y121F marker was geschikt om de drie *Aspergilli* te onderscheiden. Dit resultaat werd ook geconfirmeerd door het testen van additionele isolaten (drie *Aspergillus fumigatus*, zes *Aspergillus lentulus* en twaalf *Aspergillus felis*). Concluderend was het mogelijk om *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus lentulus* en *Aspergillus felis* te onderscheiden middels de AsperGenius® PCR.

CONCLUSIE

In dit proefschrift zijn meerdere onderzoeken verricht naar invasieve aspergillose bij patiënten met een hematologische ziekte. Dit resulteerde in nieuwe inzichten in de epidemiologie, risicofactoren en diagnostiek van invasieve aspergillose. Risicofactoren voor het ontwikkelen van invasieve aspergillose in allogene stamceltransplantatie patiënten zijn neutropenie, lymfocytopenie, een verminderde functie van de nieren, een verminderde longfunctie, het reactiveren van cytomegalovirus en het gebruik van prednisolon. Het inhaleren van L-AmB voorkomt invasieve aspergillose in patiënten met acute myeloïde leukemie tijdens hun intensieve chemotherapie. Deze profylactische behandeling is tevens kosteneffectief. De galactomannan antigeentest heeft een goede diagnostische waarde in het cerebrospinal vloeistof en kan gebruikt worden voor het aantonen of uitsluiten van cerebrale aspergillose. De AsperGenius® PCR heeft een goede diagnostische waarde op longvloeistoffen, ook wanneer er geen *Aspergillus* groeit uit de longvloeistof. Daarbij kon de PCR *Cyp51A* mutaties aantonen welke correleren met azoolresistentie. Het aantonen van deze *Cyp51A* mutaties was tevens geassocieerd met het falen van azooltherapie. Ten slotte is het mogelijk om met deze PCR onderscheid te maken tussen *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus lentulus* en *Aspergillus felis*, drie verwante *Aspergilli* uit de sectie *Fumigati*.