

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung: Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Vergleich der Light-cycler-PCR
mit anderen molekularbiologischen Nachweisverfahren
zum Nachweis von Aspergillus- und Candida-DNA
im Blut von Patienten
nach allogener Knochenmarkstransplantation.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Nicole Michaela Hunecken, geb. Flues

aus
Stuttgart

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele
2. Berichterstatter: Frau Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Pilze	4
1.2.	Systemische Pilzinfektion und ihre klinische Bedeutung.....	5
1.3.	Pathogenese und Krankheitsbilder von invasiven Mykosen	6
1.4.	Candida-Infektionen	7
1.5.	Aspergillus-Infektionen	9
1.6.	Risikofaktoren und Klinik systemischer Mykosen.....	11
1.7.	Diagnostik systemischer Mykosen	12
1.8.	Therapie systemischer Mykosen	14
1.9.	Candidiasis	16
1.10.	Aspergillose	16
1.11.	Prophylaxe systemischer Mykosen	16
1.12.	Fragestellung und Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialien und Bezugsquellen	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2.	Verbrauchsgegenstände	21
2.1.3.	Enzyme, Antikörper, Nukleotide, Primer	21
2.1.4.	Chemikalien.....	22
2.2.	Methoden	23
2.2.1.	Herstellung von Verdünnungsreihen aus Pilzkulturen	23
2.2.2.	Extraktion von Pilz-DNA	23
2.2.2.1.	Extraktion mit RCLB, WCLB und Lytikase	23
2.2.2.2.	Extraktion mit Triton X 100	26
2.2.2.3.	Extraktion mit Saponin.....	26
2.2.2.4.	RCLB-Ansatz in 2ml-Eppendorf-Cups	27
2.2.2.5.	WCLB-Ansatz in 2ml-Eppendorf-Cups	27
2.2.2.6.	Probenvolumen.....	27
2.2.3	Aufreinigung des Extraktionsproduktes	28
2.2.3.1.	Qiagen Kit	28
2.2.3.2.	High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).....	29
2.2.3.3.	E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (peq lab)	30
2.2.3.4.	peqGOLD GelPure™ Kit	31
2.2.3.5.	peqGOLD DNAPure™PT	32
2.2.4.	PCR.....	33
2.2.4.1.	Primer	37
2.2.4.1.1.	Asp sp. + Fung 2.....	37
2.2.4.1.2.	C.alb sp. + Fung 2.....	39
2.2.4.1.3.	Aspspez 1 + 2: Aspergillus fumigatus retrotransposon.....	40
2.2.4.2.	Multiplex-PCR	41
2.2.4.3.	Nested PCR	43
2.2.4.3.1.	Taq-Polymerase	44
2.2.4.3.2.	Pfu-Polymerase.....	45

2.2.4.3.3.	AmpliTaq Gold -Polymerase.....	48
2.2.5.	Quantifizierung.....	51
2.2.5.1.	DIG-labeling PCR-Elisa.....	51
2.2.5.2.	Gelelektrophorese.....	55
2.2.5.3.	Detection Test Strips	57
2.2.6.	Light Cycler™.....	58
2.2.6.1.	Vorteile des LightCycler™.....	58
2.2.6.2.	Sondenkombinationen	62
2.2.7.	Sequenzierung	64
2.2.8.	Statistische Analyse.....	66
3.	Ergebnisse.....	68
3.1.	Extraktion	68
3.1.1.	RCLB-Ansätze	68
3.1.2.	Zentrifugieren bei 13.000 U/min.....	68
3.1.3.	Probenvolumen.....	69
3.2.	Aufreinigung des Extraktionsproduktes	69
3.3.	PCR.....	70
3.3.1.	Primer	70
3.3.1.1.	Asp sp. + Fung 2.....	70
3.3.1.2.	C.alb sp. + Fung 2.....	70
3.3.1.3.	Aspspez 1 + 2	71
3.3.2.	Multiplex-PCR	71
3.3.3.	Nested PCR	72
3.3.3.1.	Nested PCR mit Taq-Polymerase.....	72
3.3.3.2.	Nested-PCR mit Pfu-Polymerase	73
3.3.3.3.	Gold Taq-Polymerase.....	73
3.4.	Quantifizierung.....	73
3.4.1.	DIG-labeling PCR-Elisa.....	73
3.4.2.	Detection Test Strips	74
3.5.	Light Cycler™.....	74
3.5.1.	Umfang der Light Cycler Studie	74
3.5.2.	Konditionierungstherapie	75
3.5.3.	Patientenkollektiv	75
3.5.4.	Vergleich der Testergebnisse.....	76
3.5.5.	Ergebniskorrelation	78
3.5.5.1.	Proben.....	78
3.5.5.2.	Patienten	79
3.5.6.	Zeitpunkt der erstmaligen Reaktivierung im Vergleich	80
3.5.7.	Therapiesteuerung	81
3.5.8.	Klinischer Vergleich.....	82
3.6.	Sequenzierung	84

4.	Diskussion	85
4.1.	Extraktion von Pilz-DNA	86
4.1.1.	Extraktion mit RCLB, WCLB und Lytikase	86
4.1.2.	Extraktion mit Triton X 100 oder Saponin.....	87
4.1.3.	Zentrifugieren bei 13.000 U/min.....	88
4.1.4.	Probenvolumen.....	88
4.1.5.	Gesamte Extraktion	89
4.2.	Aufreinigung des Extraktionsproduktes	89
4.3.	PCR.....	90
4.3.1.	Primer	91
4.3.2.	Multiplex-PCR	92
4.3.3.	Nested PCR	92
4.4.	Quantifizierung.....	93
4.4.1.	DIG-labeling PCR-Elisa.....	93
4.4.2.	Detection Test Strips	94
4.5.	Light Cycler TM	94
4.5.1.	LightCycler und PCR-Elisa im Vergleich.....	95
4.5.1.1.	Zeitpunkt der erstmaligen Reaktivierung im Vergleich	97
4.5.1.2.	Therapiesteuerung	97
4.5.1.3.	Klinischer Vergleich.....	97
4.5.2.	Common-Pilz-Sonde	98
5.	Zusammenfassung	99
6.	Literatur	101

1. Einleitung

1.1. Pilze

Von den zu den Eukaryonten gehörenden Pilzen gibt es etwa 100 000-200 000 Arten, wovon nur ca. 300 humanpathogen sind. Davon wiederum verursachen weniger als ein Dutzend weit über 90% aller Pilzinfektionen (57, 74). Trotz des vielfältigen Vorkommens der Pilze auf der Erde und des sehr häufigen Kontaktes des Menschen mit diesen Erregern kommen Systemmykosen relativ selten vor.

Dies ist unserem Immunsystem zu verdanken, das sich aus verschiedenen Faktoren zusammensetzt. Zunächst sind die mechanischen Barrieren zu nennen. Die Haut und die Schleimhaut mit ihrer Schleimsekretion und Ziliarbewegung wehren den Hauptteil der Erreger ab. Des Weiteren sind die humoralen Faktoren zu nennen, darunter versteht man Proteine und Enzyme z. B. der Speichel – oder Tränenflüssigkeit, die die Erreger zersetzen, bevor diese in die Blutbahn gelangen können. Bezüglich der Infektabwehr kommt den zellulären Faktoren, wie der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen, die größte Rolle zu, aber auch die Normalflora von Haut und Schleimhaut wird zu den zellulären Faktoren gezählt. In der Faktorengruppe der spezifischen Immunität haben die T-Zellen eine wichtige Funktion. Ist diese gestört, was z.B. bei Patienten mit AIDS, Lymphomen, Leukämien, Sarkoidose oder unter immunsuppressiver Therapie der Fall ist, so treten gehäuft opportunistische Pilzinfekte auf, die sich teilweise zu schwerwiegenden Komplikationen entwickeln können (74).

Die meisten humanpathogenen Pilze lassen sich in zwei Hauptgruppen einordnen: Die erste Gruppe bilden die filamentösen Pilze. Ihre unter dem Mikroskop gut erkennbare Grundeinheit wird Hyphe genannt. In diese Gruppe gehören die *Aspergillus* spp.. Die zweite große Gruppe wird von den unizellulären Hefen gebildet, bekanntester Vertreter hiervon ist *Candida albicans*. Des Weiteren gibt es die dimorphen Pilze, die sowohl als Hefe als auch in der Myzelform vorkommen können, und die relativ kleine Gruppe der Dermatophyten, die Erreger von Infekten der Haut und der Hautanhangsgebilde (74).

1.2. Systemische Pilzinfektion und ihre klinische Bedeutung

Neben den Mykosen, die klinisch in 1. primäre Systemmykosen, 2. in opportunistische Systemmykosen, zu diesen gehören die Candidose und die Aspergillose, 3. in subkutane – und 4. in kutane Mykosen unterteilt werden, können Pilze auch Pilzallergien, die von der allergischen Rhinitis über das Asthma bronchiale bis hin zur exogenallergischen Alveolitis reichen, und Mykotoxikosen auslösen. Bekanntestes Beispiel hierfür ist die Aflatoxikose, hervorgerufen durch Aflatoxin B₁, als Cumarinderivat ein starkes Zellgift, das von den Pilzen *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* (22) gebildet wird, und unter Verdacht steht, bezüglich der Ätiologie des primären Leberzellkarzinoms in Afrika und Südostasien eine große Rolle zu spielen. (57, 74).

Weltweit wird besonders in den letzten 20 Jahren ein ständiger Zuwachs invasiver Mykosen beschrieben (37, 79, 87, 112, 117). Diese Infektionen sind mit einer hohen Mortalität verbunden (24), insbesondere Patienten mit persistierender Neutropenie sind gefährdet (1, 158). Das Risiko an z.B. einer invasiv pulmonalen Aspergillose (IPA) zu erkranken steht im direkten Zusammenhang zur Dauer der Neutropenie (107, 119). Die Mortalität in den USA ist im Zeitraum zwischen 1982–1992 von 0,3–auf 0,9 / 100 000 angestiegen (74). Dies gilt als Folge einer zunehmenden Anzahl von immunsupprimierten Patienten: Einerseits durch die Ausbreitung der HIV-Infektionen, andererseits durch die Zunahme der Organtransplantationen (79, 83,85).

Jährlich werden in Europa ca. 20.000 Stammzelltransplantationen durchgeführt. Die Neutropeniephase bei der PBSCT (peripheral blood stem cell transplant) ist im Vergleich zur Knochenmarkstransplantation kürzer, dadurch ist auch das Risiko an einer Pilzinfektion zu erkranken reduziert (131). Hauptindikationen für allogene Transplantationen sind die schwere angeborene oder erworbene aplastische Anämie, die akute und chronische Leukämie, die akute Osteomyelofibrose und das myelodysplastische Syndrom (40).

Schon relativ bald nach der Transplantation auftretende Pilzinfektionen sind als Reaktivierung von vor der Transplantation durchlaufenen Infektionen zu sehen, späte Pilzinfektionen sind oft mit einer Abstoßungsreaktion oder mit einer GVHD und der dadurch erforderlichen Therapie verbunden (38). Neben den Pilzen können auch Viren wie CMV, EBV oder Adenoviren nach einer Transplantation reaktiviert werden und so

Krankheiten mit hoher Mortalität zur Folge haben, insbesondere bei nicht HLA-identischen Spender-Empfänger-Kombinationen (38). Diese Patienten sind einem sehr viel höheren Infektionsrisiko ausgeliefert (4). Während der Neutropeniephase, die bis zu drei Wochen nach der Transplantation andauern kann, sind neben den Pilzinfektionen auch Infektionen durch Viren oder gram-negative Stäbchen (4), gram-positive Kocken und auch alveoläre Hämorrhagie, Lungenödem und Medikamentenunverträglichkeiten klassische Komplikationen, wobei die Pilzinfektionen eher auftreten, wenn die Granulozytenanzahl bereits am ansteigen ist (99). Im Zeitraum zwischen der 4. und der 15. Woche nach der Transplantation dominieren die CMV- und die Pneumocystis carinii-Pneumonien. Die späte Phase jenseits der 15. Woche ist durch Erkrankungen wie Broncheolitis obliterans, eventuell mit einer Pneumonie einhergehend, und durch die chronische Graft versus Host Reaktion gekennzeichnet (155).

1.3. Pathogenese und Krankheitsbilder von invasiven Mykosen

Die invasive Pilzinfektion ist für immunsupprimierte Patienten eine lebensbedrohliche Erkrankung und spielt eine große Rolle bei der zunehmenden Morbidität und Mortalität dieses Patientenkollektives (119, 124, 134). Im letzten Jahrzehnt entwickelten laut *Wald et al* (146) etwa 5% der Knochenmarkstransplantierten Patienten eine Pilzinfektion während der Neutropeniephase. Die Inzidenz von Pilzinfektionen variiert zwischen 4% bei AIDS-Patienten, 13 % bei Patienten nach einer Herztransplantation und 20% bei Patienten nach einer Knochenmarkstransplantation (29, 35). Die häufigsten Erreger von invasiven Mykosen sind derzeit mit abnehmender Häufigkeit *Candida* - und *Aspergillus* spp. (79, 126, 140), sie sind laut *Yoshida* (158) für 80% dieser Mykosen verantwortlich zu machen. Leider sind aber auch immer häufiger andere Pilzspezies Auslöser für Pilzinfektionen (9, 66, 80, 125).

1.4.

Candida-Infektionen

Pilzkrankungen hervorgerufen durch Candidaspezies nennt man Candidiasis. Betrifft die Erkrankung die Haut oder die Schleimhäute (Mundhöhle, Ösophagus, Vagina) so wird sie auch als Soor bezeichnet. Klinisch lässt sich die oberflächliche Candidiasis der Haut, Schleimhaut und Nägel von der invasiven Candidiasis mit Organbeteiligung abgrenzen (98).

Von allen opportunistischen Pilzen ist Candida die für die Medizin am relevantesten und auch am häufigsten aus klinischem Material isolierten Pilzspezies (12, 98, 100, 145). So spielt bei den Hefen *C. albicans*, ein Bestandteil der Normalflora des Gastrointestinaltraktes (95, 100), mit einem Anteil von 70% aller invasiver Candidosen die wichtigste Rolle, gefolgt von *C. tropicalis* und *C. glabrata* (44). *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, und *Cryptococcus neoformans* sind zusammen für 95 - 98% von allen invasiven Infektionen durch Hefen verantwortlich zu machen (106, 115, 122). Die non-*albicans* Candidosen sind allerdings, wie in den Letzten beiden Dekaden festzustellen war, auf dem Vormarsch (143). So riefen in einer Studie von *R. Wingard* 1995 in einem onkologischen Patientengut die Non-*albicans* spp. 46% der Candidainfektionen hervor (153). *Candida glabrata* bildet mittlerweile den größten Anteil unter den Candidainfektionen von KMT-Patienten mit Fluconazolprophylaxe (153). Eine Infektion mit dieser Spezies bei gefährdeten Patienten ist mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden, obwohl *Candida glabrata* eine geringere Virulenz als *Candida albicans* aufweist.

Bei einer Candidiasis handelt es sich typischerweise um eine von der Normalflora der Haut oder des Gastrointestinaltraktes ausgehende endogene, zunächst die Haut oder Schleimhäute befallende Infektion (Soor), die bei geschwächtem Immunsystem zu einer sekundären hämatogenen Streuung in andere Organe wie Gehirn, Netzhaut, Lunge sowie Myokard, bevorzugt aber Niere, Milz und Leber führen kann (hepatolienale Form der Candidose) (57, 74, 98). Dort können dann multiple Mikroabszesse entstehen. Die relativ häufig auftretende hämatogene Ausbreitung der Hefepilze bei immunsuppremierten Patienten führt zu lebensbedrohlichen, disseminierten Infektionen und trägt erheblich zur hohen Mortalität dieser Patienten bei (145). Auf der Liste der Sepsis auslösenden Infektionen steht diese von *Candida* ausgelöste disseminierte

Infektion mit einer Mortalitätsrate von etwa 50 % an vierter Stelle. AIDS-Patienten erkranken häufig auch an Mundsoor, Candida-Ösophagitis oder Vulvovaginitis (98). Zu einer Candidiasis kann es auch durch eine Besiedelung an intravasal oder intravesical gelegenen Kunststoffen kommen (57, 98).

Der Nachweis von Candida im Urin kann neben einer unter Umständen asymptomatischen Kolonisation der Harnblase, insbesondere bei Patienten mit Dauerkathetern, Patienten unter Antibiose, Patienten mit Diabetes oder Patienten mit Harnabflussstörungen, auch auf eine disseminierte Candidiasis hinweisen (98).

Im Rahmen einer Candida-Sepsis bei immunsuppremierten Patienten kann es zu einer lokalen oder diffusen Candida-Pneumonie kommen (98).

Ein Befall des Peritoneums ist nach abdominalchirurgischen Eingriffen oder durch Besiedelung des Peritonealkatheters bei dialysepflichtigen Patienten möglich (98).

Von einer vorgeschädigten Herzklappe kann ähnlich wie bei einer bakteriellen Endokarditis eine Candida-Endokarditis hervorgehen. Wie die Patienten mit Klappenvitien sind auch Patienten mit intravenösen Kathetern, Patienten unter Chemotherapie, postoperativer Antibiose oder Personen mit intravenösem Drogenabusus durch eine mögliche Candida-Endokarditis gefährdet (98).

Die Candidiasis zeigt sich häufig in oberflächlichen Entzündungen der Haut bzw. Schleimhaut mit weißlichen, fleckigen, schwer abstreichbaren Belägen, vorzugsweise in Hautfalten, da sich die Hefen an warmen und feuchten Stellen besonders gut vermehren (submammäre Candidiasis, Soor im Mund oder Genitalbereich). Bei beeinträchtigter Immunabwehr verläuft die invasive Candidiasis oft foudroyant, ansonsten beginnt sie mit allgemeinem Krankheitsgefühl und mit undulierendem Fieber. Am Augenhintergrund können weißlich schimmernde Herde, und auf dem Röntgen-Thorax-Bild fleckförmige Infiltrate auffallen. Mikrohämaturie und Leukozyturie können auf eine Mitbeteiligung der Nieren hinweisen (59).

1.5.

Aspergillus-Infektionen

Unter den Schimmelpilzen stellt *Aspergillus fumigatus* neben *Aspergillus flavus*, und *Aspergillus niger* das größte klinische Problem dar, da er in über 90% aller Patientenisolaten nachzuweisen ist (14, 57, 74). Nur 16 von über 130 bekannten *Aspergillus*-spp. sind als humanpathogen einzuschätzen. Von diesen Spezies ist *A. fumigatus* der führende Auslöser von der noninvasiven und der invasiven Aspergillose. Dieser Pilz ist für mehr als 60% der invasiven Aspergillosen bei immunsopprimierten Patienten verantwortlich. *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus flavus* sind zusammen die Spezies, die am häufigsten Infektionen verursachen (laut Iwen et al 88,7%(63)), es wurden aber auch Berichte von Infektionen, hervorgerufen durch andere Spezies wie *Aspergillus terreus* (9,8%), *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, und *Aspergillus ustus*, dokumentiert (21, 101). Infektionen mit *Aspergillus* spp. sind laut Pfaller mit einer Mortalität von 85 % verbunden (116), insbesondere bei Resistenz der Pilze gegenüber der antifungalen Therapie ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten deutlich herabgesetzt (79). 4% der Patienten die in modernen europäischen Lehrkrankenhäusern versterben haben eine invasive Aspergillose. Sie ist die häufigste Infektions-Todesursache bei Leukämie- und Knochenmarkstransplantations-Patienten (33). *Aspergillus fumigatus* kann eine opportunistische invasive Infektion bei immunsopprimierten Patienten (124) und andererseits Allergien bei Atopikern hervorrufen (33). Die umweltresistenten Sporen sind in vielen Materialien wie Blumenerde, Klimaanlage, in getrockneten Nahrungsmitteln wie Gewürzen, Kaffee oder Tee sowie im bei Baumaßnahmen anfallenden Staub zu finden (57).

Die Aspergillose ist also eine aerogene Infektion ausgehend von faulenden Pflanzenresten oder Konidien enthaltenden Materialien, die meistens als pulmonale Mykose mit den klinischen Zeichen einer Pneumonie beginnt (in einer Studie von Nosari et al. 90%) (79, 109). Konidien sind etwa 2 – 3,5 µm große, grüne, extrem hydrophobische Sporen, die bei lediertem Immunsystem, besonders bei Patienten mit prolongierter Neutropenie, zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung, der invasiven Aspergillose führen können. Eine Besiedelung chronisch entzündlicher Prozesse in der Mundhöhle oder dem Darmtrakt ist allerdings auch möglich (59, 74). Von dort aus kann

sie sich hämatogen oder lymphogen, besonders bei im Rahmen von Chemotherapie oder Immunsuppression beeinträchtigter Makrophagenfunktion, in andere Organe wie Niere, Herz, Auge, Leber und ZNS ausbreiten (59). Das Gehirn ist das von *Aspergillus fumigatus* und - *flavus* meist invadierte Organ, während *Aspergillus terreus* sich eher am Herzen einnistet (63). Meistens ist eine chirurgische Entfernung des Herdes notwendig (74).

Typische durch *Aspergillus* hervorgerufene Krankheitsbilder sind 1. die bronchopulmonale Aspergillose, 2. die Aspergilluspneumonie, 3. die Otitis externa, 4. die Sinusitis, 5. die Endophthalmitis und 6. die disseminierte septische Aspergillose (59, 74). Patienten mit Aspergillose neigen gehäuft dazu eine GvHD zu entwickeln (4).

Bei der bronchopulmonalen Aspergillose handelt es sich um einen Pilzknoten der, Aspergillom genannt wird und meist in einer vorbestehenden Höhle oder Kaverne entsteht.

Die bei abgeschwächter Immunlage auftretende Aspergilluspneumonie, geht meist nur mit Husten und Fieber, teilweise mit Pleuraschmerzen aber ohne typische radiologische Zeichen einher (119). Sie kann sich zu einer, für neutropene Patienten, lebensgefährlichen Komplikation, der invasiven pulmonalen Aspergillose (IPA), weiterentwickeln (120), die mit einer hohen Mortalität einhergeht. *Aspergillus fumigatus* ist in der Lage durch die Sezernierung von extrazellulären Proteinasen Strukturproteine in der Lunge und der Basalmembran zu hydrolysieren (82) und kann so zu einer pulmonalen Hämorrhagie führen (72).

Die Sinusitis wird meist durch die Pilze *A. fumigatus* und *Penicillium* spp. hervorgerufen (36) (*Hendolin et al* (58) fanden bei 88% von Patienten mit chronischer Sinusitis Pilze in polypösen Gewebeproben).

Die Endophthalmitis tritt typischerweise 2-3 Wochen nach einer Verletzung oder Operation am Auge auf und führt leider häufig zum Verlust des Auges.

1.6. Risikofaktoren und Klinik systemischer Mykosen

Alle Faktoren, die eine Pilzinfektion ermöglichen, können auf einen Nenner gebracht werden: Immundefizienz. Sei es durch angeborene Immundefekte, durch die Infektion mit HIV, durch die Immunsuppression nach einer Transplantation oder durch eine Chemotherapie. Im Rahmen solcher aggressiven Chemotherapieschemata wird die protektive, mechanische Schleimhautbarriere durchbrochen und die Neutropeniephase hämatologischer Patienten verlängert und verstärkt. Dadurch werden opportunistische Pilzinfektionen bei diesen Patienten begünstigt (98, 125, 126, 129). Die Pilze werden normalerweise von Makrophagen und den neutrophilen Granulozyten phagozytiert, welche Zytokine sezernieren und somit die Hyphenbildung der Pilze verhindern (95).

Durch die gestörte T-Zell-Immunität der AIDS-Patienten haben pathogene Keime wie Pilze bei der Kolonisierung und oberflächlichen Invasion leichtes Spiel.

Aber dem größten Risiko ausgesetzt sind neutropene Patienten in der immunsuppressiven Therapie vor und nach einer Transplantation. Insbesondere Empfänger mit nicht verwandten Spendern (11, 37, 113). Wegen der persistierenden Immunsuppression und wegen einer eventuellen GvHD ist die Mortalität bei diesen Patienten höher als bei Patienten nach einer Chemotherapie (65, 119). Laut *Denning* liegt die Mortalitätsrate von invasiv-pulmonalen Aspergillosen bei neutropenen Patienten zwischen 40% und 80% (31).

Um sicherzustellen, dass nach einer allogenen Transplantation die Spenderzellen nicht vom Immunsystem des Empfängers erkannt und eliminiert werden, wird eine Neutropenie, ein kombinierter T- und B-Zelldefekt und ein Defekt der Makrophagen induziert (129). Intakte Makrophagen würden die Umwandlung der Aspergilluskonidien in Hyphen inhibieren, während funktionsfähige neutrophile Granulozyten direkt die Aspergillushyphen eliminieren würden (5). Immunkompetente Patienten mit normaler Funktion der Makrophagen und der Neutrophilen erkranken durch eine pulmonale Infektion mit aerogen aufgenommenen Aspergillussporen allenfalls an einem Aspergillom in einer vorbestehenden Höhle. Bei Immunsupprimierten Patienten dagegen besteht ein hohes Risiko, dass sie an einer invasiven pulmonalen Aspergillose (IPA) durch gewebedestruierende Hyphen erkranken (119): Diese IPA zeigt die höchste

Inzidenz und Mortalität bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen während einer Chemotherapie oder nach einer Knochenmarkstransplantation.

Neben neutropenen Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, Empfängern von peripheren Blut oder Knochenmarkstammzelltransplantaten, Empfängern von Organtransplantaten und AIDS-Patienten werden auch Diabetes- oder Geriatriepatienten, Schwangere, Kinder in neonatologischen Intensivstationen, Patienten mit zystischer Fibrose oder Granulomatose, Patienten mit größeren chirurgischen Wunden, Patienten unter Langzeitbeatmung, Patienten mit schweren Verbrennungen und Drogenabhängige zum Hauptrisikokollektiv einer Pilzerkrankung gezählt (7, 28, 32, 57, 85).

Durch den vermehrten Einsatz von Breitbandantibiotika, besonders bei intensivpflichtigen Patienten, wird das Wachstum der endogenen bakteriellen Darmflora unterdrückt und dadurch die ungehemmte Vermehrung von Candidaspezies begünstigt. Auch die Kortikosteroidbehandlung mit ihrer immunsuppressiven Wirkung, die bei einer GvH-Reaktion erforderlich wird, ist dazu in der Lage (11, 57, 98, 112). Eine GvH-Reaktion ist die von den Spenderzellen ausgehende Eliminierung der Wirtszellen (129).

1.7. Diagnostik systemischer Mykosen

Die Identifizierung der Pilze erfolgt üblicherweise über die Anzüchtung einer Kultur in einem Nährmedium oder über den mikroskopischen Nachweis der Zellen im Gram- oder Nativpräparat (98). *Candida albicans* erscheint unter dem Mikroskop als etwa 5µm große, ovale, gram-positive Hefe, teilweise sind Tochterzellen, die sogenannten Blastosporen, oder ein Pseudomycel zu erkennen (57, 74).

Aspergillus erkennt man an den ungefähr 3-4 µm breiten filamentierten, septierten Hyphen.

Da die Anzüchtung der Pilze zwei bis drei Tage dauert (12, 145), sind diese Methoden aber leider sehr zeitintensiv. Hinzu kommt die limitierte Sensitivität und Spezifität (39), da die Identifizierung nicht bis auf die Ebene der Spezies erfolgen kann (126) und nicht

zwischen Kolonisierung, invasiver Erkrankung oder Kontamination unterschieden werden kann (61).

Des Weiteren können zur schnellen Diagnostik die Bestimmung der spezifischen Antikörper gegen Pilzantigene herangezogen werden, allerdings nicht bei immunsupprimierten Patienten, da bei ihnen die humorale Immunantwort gestört ist. Oder die Antigene selbst können mittels einer Agglutinationsreaktion (74) nachgewiesen werden, bei Candidosen freies Mannan (27), bei Aspergillosen Galactomannan, der Hauptbestandteil der Aspergilluszellwand (97). Diese serologischen Tests sind hoch spezifisch, es mangelt ihnen jedoch nicht selten an Sensitivität (144, 145, 148).

Des Weiteren können Stoffwechselprodukte der Pilze wie D-Arabinitol oder 1,3- β -D-Glucan nachgewiesen werden (121).

Der Nachweis der häufigsten humanpathogenen Pilze gilt als schwierig. Einerseits weil ubiquitär vorkommende Aspergillussporen das Untersuchungsmaterial kontaminieren können, andererseits zeigen viele der Blutkulturen, auch bei histologisch nachgewiesener invasiver Mykose, ein negatives Ergebnis (92). Dies ist bedingt durch die Unzugänglichkeit zum Infektionsherd, eine Vorbehandlung mit Antimykotika oder die geringe Anzahl der Pilzzellen im Blut von neutropenen Patienten mit invasiver Candidiasis, die in über der Hälfte der Fälle unter 100 CFU/ml Blut liegt. Auch bei Patienten mit invasiver Aspergillose sind positive Blutkulturen sehr selten (39, 55, 85, 146, 157). Außerdem sind auch BAL-Kulturen von Patienten mit pulmonaler Aspergillose häufig negativ (120), laut *van Eich* variiert die Sensitivität der Bronchoskopie mit BAL zwischen 21% und 83% (144). Ein weiteres erhebliches Problem ist die Dauer der Austestung. In der Regel ist die Erkrankung bei Erhalt des Ergebnisses leider schon fortgeschritten (140, 157).

Kommerziell erhältliche Antigentests oder Galactomannan-Agglutinationstests weisen ebenfalls, besonders bei Beginn einer Infektion, eine geringe Sensitivität und Spezifität auf (53, 85, 125).

Auch die klinischen Zeichen für eine Pilzinfektion sind unspezifisch und können deshalb unter Umständen erst verspätet als Pilzinfektion gewertet werden (58, 94, 118).

Außerdem tragen regelmäßige radiologische Untersuchungen des Thorax unter Umständen auch der Nasennebenhöhlen zur Diagnostik bei. Aber auch diese Untersuchungen sind nicht spezifisch (126).

Mit letzter Sicherheit kann eine invasive Aspergillose nur über eine Biopsie, die aber bei den kritisch erkrankten, febrilen, neutropenen, unter Umständen thrombopenen Patienten nicht so ohne weiteres verfügbar ist, oder gar erst während der Autopsie diagnostiziert werden (10, 30, 49, 128, 145).

Die steigende Inzidenz der invasiven Mykosen verdeutlicht die Notwendigkeit die diagnostischen Methoden zu verbessern (16, 134, 138, 149). Eine sinnvolle Ergänzung zur Blutkultur wäre die PCR, mit der man Teile des Erbmaterials der Pilze nachweisen kann (58, 78, 91, 93, 100). Bemühungen schnellere diagnostische Verfahren zu finden haben verschiedene molekularbiologischen Methoden hervorgebracht. Die Pilze können über den Nachweis von Genen wie dem Gen für die kleine rRNA- Untereinheit (48, 51, 69, 139, 140), für die 5.8 S rRNA-Untereinheit, für die Lanosterol- Demethylase (103, 104), über mitochondriale DNA (43, 67), oder über die adjacent nontranscribed spacer region, und die noncoding internal transcribed spacer (ITS) region der rRNA-Gene (19, 45, 46 108) diagnostiziert werden. Eine Speziesidentifizierung gelingt mit dem Nachweis von rRNA Genen. Mit der PCR und mit anschließender Hybridisierung der Amplifikate mit Spezies-spezifischen Sonden kann eine Vielzahl von Pilzen detektiert werden (42, 60, 128, 140, 145). Das gleiche kann mit der nested PCR (17, 64, 132, 152, 159) die erstmals von *Yamakami et al.* beschrieben wurde (156), oder mit einer PCR in Kombination mit einer Restriktions-Enzym-Analyse (103, 104) erreicht werden.

1.8. Therapie systemischer Mykosen

Bei neutropenen Patienten sollte aufgrund der hohen Letalität einer Pilzinfektion schon bei klinischem Verdacht eine Therapie eingeleitet werden (112, 118). Das bedeutet, dass bei fiebernden, neutropenen Patienten nach 3-4 Tagen erfolgloser Antibiose (154) oder bei radiologisch neu aufgetretenen Lungeninfiltraten (20) empirisch eine Amphotericin

B- Therapie eingeleitet werden sollte. Eine Pilzinfektion ist bei Auftreten von Thoraxschmerzen oder Hämoptysen ebenfalls sehr wahrscheinlich (119). Laut Dini et al. (38) bleiben die Ursachen von Fieberepisoden häufig ungeklärt, sind aber in einem Viertel der Fälle von Bakterien, meist Gram-positiven Kocken, verursacht.

Pilze sind empfindlich gegenüber Polyenen, Azolen, 5-Fluorocytosin, und dem Antibiotikum Griseofulvin, das bei kutanen Mykosen begleitend zur lokalen Therapie oral verabreicht werden kann (74). Polyene sind die am häufigsten verwendeten Antimykotika. Sie bilden Komplexe mit Ergosterol, dem Hauptbestandteil der Pilzmembran, und zerstören somit die Membranstruktur bzw. die Membranpermeabilität. Auf diese Weise wird ein intrazellulärer Natrium- und Kaliumverlust induziert. Aufgrund ihrer Wirkungsweise zählen sie zu den Breitbandmykotika und bilden die wirksamste Substanz bei generalisierten Mykosen (71, 74).

Vertreter dieser Gruppe sind Amphotericin B, und AmBisome. Diese werden systemisch bei Systemmykosen eingesetzt. Amphotericin B ist zur Zeit das wirksamste Breitbandantimykotikum. Leider ist die Behandlung mit Amphotericin mit schweren, vor allem renalen, Nebenwirkungen verbunden (71, 125, 126), denn es bindet nicht nur an das Ergosterol der Pilzzellmembran, sondern auch an das Cholesterin in humanen Membranen und bewirkt auch dort eine Änderung der Permeabilität (56). Das Medikament ist schlecht gewebeängig. Hepato- Nephro- und Neurotoxizität (bei intralumbaler Gabe) sind neben Schüttelfrost, Fieber Thrombophlebitis, Blutbild- und Elektrolytveränderungen schwere Nebenwirkungen. Die renale Toxizität entsteht durch die Wirkung an den Tubuli und durch eine Vasokonstriktion, die einen Anstieg der Retentionswerte hervorruft. Bei einem Überschreiten der Kumulationsdosis von etwa 4-5 g muss ein irreversibler Verlauf der Nierenschädigung angenommen werden (71). Leider treten bei einigen *Aspergillus* spp. Resistenzen gegen Amphotericin B auf, insbesondere *A.terreus*-Infektionen sind mit einer niedrigen Überlebenswahrscheinlichkeit gekennzeichnet (79).

AmBisome ist das liposomal verkapseltes Amphotericin B welches dadurch besser gewebeängig wird. Durch das größere Molekulargewicht ist die Nephrotoxizität vermindert und eine höhere Dosierung möglich (71, 77).

1.9. Candidiasis

Die Candidiasis wird mit Amphotericin B oder AmBisome behandelt, 4x täglich oral bei Befall der Mundhöhle oder des Ösophagus, die systemische Applikation, eventuell in Kombination mit Flucytosin, ist bei der invasiven Candidiasis für zwei Wochen erforderlich (59, 71). Immunsupprimierte Patienten erhalten eine Antimykotika-Prophylaxe (57, 59).

1.10. Aspergillose

Ebenfalls mit Amphotericin B oder mit Itraconazol lässt sich die Aspergillose behandeln (33, 71). Hierdurch wird aber nur eine Suppression der Infektion, nicht die Eliminierung der Erreger erreicht. Aus diesem Grund sollten die Herde chirurgisch angegangen werden (59). Laut Salerno et al. (127) beendete eine chirurgische Resektion der Lungenherde bei 69% der Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillose (IPA) die Aspergillusinfektion, auch nach Reichenberger et al ist die Lungenteilresektion eine therapeutische Option eine invasive pulmonale Aspergillosis (IPA) neutropener Patienten zu behandeln, bei niedriger operationsbedingter Morbidität and Mortalität (119) trotz der Gefahr der unkontrollierbaren Blutung aufgrund der Thrombopenie oder Infektion aufgrund der Neutropenie.

1.11. Prophylaxe systemischer Mykosen

Um neutropene Patienten vor Pilzinfektionen zu schützen hat man begonnen ihnen prophylaktisch Antimykotika wie Fluconazol oder Ketoconazol bzw. Amphotericin B zu verabreichen (34, 79, 125, 126, 158). Dadurch konnte zwar die Inzidenz der Candida albicans Infektionen von 80% in den 70ern auf 40% in den 90ern reduziert werden (11,

96, 133). Im gleichen Zuge konnte damit auch die Morbidität der neutropenen Patienten (13) gesenkt werden. Leider wurden aber Non-albicans spp. wie *C. glabrata*, *Candida tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, sowie *Aspergillus* spp. wie *A. fumigatus* und *A. flavus*, azolresistente *Candida*-Spezies, wie einzelne *C. albicans*-Stämme, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* (8) und *C. dubliniensis* (105), u.a. sonst nicht so häufig auftretende Pilze begünstigt und sind nun öfter für eine Pilzinfektion verantwortlich zu machen (76, 83, 133, 151, 153). Aus diesem Grund und wegen der Toxizität des derzeitigen Goldstandards Amphotericin B wird diese prophylaktische antimykotische Therapie nicht überall empfohlen oder angewandt (11, 17, 132, 145), zumal es laut *Bohme et al.* (11) und laut *Denning* (32) noch keine bewiesene, erfolgreiche Prävention der invasiven Aspergillose gibt. Die Patienten sollten in der neutropenen Phase allerdings von möglichen Pilzverunreinigungen abgeschirmt werden, d.h. sie sollten während dieser Zeit auf einer isolierten Station untergebracht werden (111), und sie sollten Mundschutz und Handschuhe tragen. Eine andere Möglichkeit wäre die regelmäßige, in kurzen Abschnitten durchgeführte PCR-Blutuntersuchung der gefährdeten Patienten und, bei einem positiven Ergebnis, die prompte erregerspezifische gezielte antimykotische Behandlung (41, 54, 78). Denn neben der Prophylaxe führt nur ein früher Therapiebeginn zu einer Senkung der Morbidität (24).

1.12. Fragestellung und Zielsetzung

Da in den letzten Jahrzehnten die Anzahl der immungeschwächten Patienten zugenommen hat, ist gleichzeitig auch die Häufigkeit der invasiven Pilzinfektionen und die Vielfalt der klinisch relevanten Pilzspezies gestiegen (26). Insbesondere Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen oder Patienten nach Transplantationen sind gefährdet, sich im Laufe ihrer Erkrankung zusätzlich eine lebensbedrohliche Pilzinfektion zuzuziehen (16).

Die Risikopatienten profitieren erheblich von einer möglichst früh eingeleiteten antimykotischen Therapie, denn damit kann die Morbidität und die Mortalität dieser

Patienten herabgesetzt werden (11, 126). Da die Virulenz der Pilze variiert, sehr virulente Spezies sind z.B. *Candida albicans* gefolgt von *Candida tropicalis* (153), ist eine prompte und genaue Identifikation der Pilzspezies erforderlich (48). Ebenfalls ein wichtiger Grund hierfür ist das Auftreten von schlecht behandelbaren Candidämien aufgrund von Fluconazol-resistenten Non-*C.albicans* Spezies oder Resistenzen gegen Amphotericin B (106) und Azole (114, 123).

Um aber eine adäquate antimykotische Therapie frühzeitig einleiten zu können, ist eine rasche, sensitive und speziesidentifizierende Diagnostik von großer Bedeutung (11, 26, 62, 136, 139). Die bisherigen diagnostischen Verfahren erfüllen diese Bedingungen aber nur unzureichend (16, 41, 75, 97, 160). Konventionellen mikrobiologischen und histopathologischen Methoden mangelt es in der Regel an Sensitivität oder an Spezifität, im schlimmsten Fall an beidem, und sie detektieren die Pilze oft erst im späteren Verlauf der Erkrankung (125, 157).

Aufgrund der oben geschilderten diagnostischen Notlage sind viele schnellere, sensitivere und weniger aufwendige Methoden entwickelt worden, unter anderem auch der PCR-Elisa und das LightCycler-Verfahren. Methoden, die auf dem Nachweis von Nukleinsäure basieren, sind der konventionellen Diagnostik im Hinblick auf Sensitivität, Schnelligkeit (23) und Vielzahl der somit diagnostizierbaren Speziestypen überlegen (140).

Das Ziel dieser Arbeit war es in erster Linie die LightCycler-Methode aber auch andere Methoden für die Routinediagnostik von Pilzen wie *Aspergillus fumigatus* oder *Candida albicans* so anwendbar zu machen, dass der Verlust an Sensitivität und Spezifität möglichst gering gehalten wird, trotzdem aber ein Ergebnis am Tag der Blutentnahme vorliegen kann.

1. Zunächst wurde die Extraktion bezüglich Probenvolumen, Pufferansätzen und Zentrifugendrehzahl so moduliert, dass eine Reduktion des Zeitaufwandes möglich werden sollte.

2. Auch wurden verschiedene Kits, die für die Aufreinigung des Extraktionsproduktes benötigt werden, getestet und mit der Routinemethode verglichen, um auch bei diesem Arbeitsschritt eine zeitliche Verkürzung des Gesamtaufwandes zu erreichen.

3. Zur Verbesserung des nächsten Arbeitsschrittes, der PCR, wurde ausprobiert, inwieweit verschiedene Primer und Primerkombinationen zu einer Steigerung der Spezifität beitragen können, und

4. inwieweit die gleichzeitige Anwendung der Primerpaare in einer sogenannten Multiplex-PCR zu einer Zeitaufwandverringerung beitragen kann.

5. Ebenfalls zur Verbesserung der PCR wurde getestet, ob mit einer Erhöhung der Zyklenanzahl mittels einer sogenannten nested-PCR, und unter Verwendung einer dafür geeigneten Polymerase, eine Steigerung der Sensitivität erreicht werden kann.

6. Die Detection Test Strips stellen eine schnelle und aufwandarme Methode der Pilzdiagnostik dar. Diese Strips wurden ebenfalls anhand von Patientenproben mit dem PCR-Elisa verglichen.

7. Des Weiteren wurden verschiedene LightCycler-Sondenkombinationen auf die Probe gesellt, mit denen man, ähnlich wie bei der Multiplex-PCR, in einem Lauf verschiedene Spezies spezifisch detektieren kann.

8. Im Hauptteil der Arbeit wurde anhand von 846 Blutproben von Patienten nach Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation die LightCycler-Methode mit der PCR-Elisa –Methode verglichen.

2

Material und Methoden

2.1

Materialien und Bezugsquellen

2.1.1

Geräte

Drucker	LaserJet III	Hewlett Packard
Programme	Word for Windows	Microsoft, München
Version 6.0	Microsoft Excel	Microsoft, München
Horizontalwippe	Rocker Platform	Bellco, Biotechnology, Vineland USA
Sterilbänke	BioGard	Baker Company, Stanford, USA
	LaminAir HBB 2448	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Biofuge A, Rotixa /KS	Heraeus, Hanau, Hettich
Wasserbäder	Thermo-Boy	Mgw-Lauda, Königshofen
PCR-Prozessor	PE 2400 thermocycler	Perkin Elmer, Dreieich, Germany
PCR-Prozessor	GeneAmp,2400	Biometra, Göttingen
Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl	Variopipetten	Eppendorf, Hamburg
Photometer	LS 500	Dr. Lange, Berlin
Elisa-Reader	Rainbow	SLT, Crailsheim
Elisa-Rüttler	MRP	SLT, Crailsheim
Wärmeschrank	B 5060	Heraeus, Hanau
Gelkammer	Horizon 11.14	GIBCO, BRL, Gaithersburg, USA
UV-Kamera	Fluolink	Biometra, Göttingen
LightCycler	2 011 468	Boehringer (Roche), Mannheim
Computer	Vectra 12	Hewlett Packard
Drucker	Ink Jet 860	Hewlett Packard
Zentrifugen-Adapter	190 9312 742	Boehringer (Roche), Mannheim
Sequenzier	PE 373A	Perkin Elmer, Foster City, USA
Vakuumtrockner	Speedvac	Bachofer, Reutlingen

2.1.2.

Verbrauchsggenstände

Reaktionsgefäße	PS 15ml, 50ml (Falcon)	Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey, USA
1,5ml PCR-Gefäße		Biozym Diagnostische GmbH, Oldendorf
2,0ml safe lock		Eppendorf, Hamburg
Extraktionssäulchen	Qiamp Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Pipettenspitzen	(10µl, 100µl, 1000µl)	Biozym Diagnostische GmbH, Oldendorf
MicroAmp PCR-Gefäß		Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut
Dig-Detection Kit	1636111	Boehringer (Roche), Mannheim
LightCycler Kit		Boehringer (Roche), Mannheim
-Hybridization Probes	2015102	Boehringer (Roche), Mannheim
Kapillaren		Boehringer (Roche), Mannheim
BigDye		Perkin Elmer, Applied Biosystems, Norwalk, Connecticut USA

2.1.3.

Enzyme, Antikörper, Nukleotide, Primer

Proteinase K		Boehringer (Roche), Mannheim
Lytikase rekombinant		SIGMA, Deisenhofen
Qiagen Tissue Kit		Hilden, Germany
High Pure PCR Template Preparation Kit		Boehringer (Roche), Mannheim
Peq Gold Gel		Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Peq Gold DNA		Peqlab Biotechnologie, Erlangen
EZNA		Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Taq-Polymerase		Perkin Elmer, Foster City, USA
Pfu-Polymerase		Stratagene, Heidelberg
dATP, dGTP, dCTP, dTTP		Promega, Madison, USA
Primersynthese		Roth, Karlsruhe
Anti-Digoxigenin-AP, Fab.Fragmente		Boehringer (Roche), Mannheim
Oligonukleotide		Roth, Karlsruhe
LightCycler Kit		Boehringer (Roche), Mannheim
LightCycler Sonden		Tib Molbiol, Berlin
TaqStart Antibody		Clontech, Palo Alto, Californien
QIAquick purification Kit		Qiagen, Hilden
BigDye Terminator Kit		Applied Biosystems, Dreieich, Germany

2.1.4.

Chemikalien

Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Ethanol 99,7%	Merck, Darmstadt
Tris	USB, Cleveland, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Boehringer (Roche), Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	SIGMA, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
75% Propanol	Merck, Darmstadt
Sabouraud-Glucose-Agar	Biomerieux, Marne-la-Vallee, Frankreich
ABTS-Substrat	Boehringer (Roche), Mannheim
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	SIGMA, Deisenhofen
Agarose	SIGMA, Deisenhofen
Gelstar	FMC BioProducts, Oldendorf, Germany
Tris Acetat EDTA (TAE-Puffer)	Roth, Karlsruhe
100-bp DNA ladder	Life Technologies, Karlsruhe, Germany

2.2.

Methoden

2.2.1. Herstellung von Verdünnungsreihen aus Pilzkulturen

Um die verschiedenen molekularbiologischen Methoden bezüglich Sensitivität und Spezifität miteinander vergleichen zu können, benötigt man Pilzproben mit definierter Zellanzahl. Zur Gewinnung dieser „Standard-Proben“ wurden zunächst die Pilzstämme 48h (*Candida* spp.) bzw. 72h (*Aspergillus* spp.) bei 30°C auf Sabouraud-Glucose-Agar angezüchtet, in 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert und dann unter Zuhilfenahme des Mc Farland-Indexes (Mc Farland A_{530} 0,5 entspricht etwa $1-5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) und der photometrisch bestimmbaren optischen Dichte die Konzentration dieser definierten Pilzsuspension eingestellt.

Eine Verdünnungsreihe (10^6 - 10^0 Zellen/ml) erhält man, indem man eine Suspension mit definierter Konzentration (10^6 Zellen/ml) in einem 1:10 Verhältnis mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt und so eine Suspension mit um den Faktor 10 reduzierter Zellkonzentration erhält. Diese Suspension kann dann wiederum als neue Ausgangssuspension weiter verdünnt werden. Jeweils 500µl dieser Standards mit 5ml EDTA-Blut vermischt können zur Simulierung klinischer Proben herangezogen werden. Heparinblut kann nicht verwendet werden, da es die Amplifikation während der PCR inhibiert (102).

2.2.2.

Extraktion von Pilz-DNA

2.2.2.1. Extraktion mit RCLB, WCLB und Lytikase

Um die Pilz-DNA im Blut nachweisen zu können, muss sie erst freigelegt und von störenden Blutbestandteilen wie Zellmembranen oder Proteinen getrennt werden. Dazu wurden die Blutproben unter der Sterilbank in Falcon-Tubes umgefüllt und darin mit 35

ml RCLB (Red Cell Lysis Buffer) vermischt. RCLB ist eine hypotone Salzlösung. Sie führt zum Einströmen von Wasser in die Erythrozyten und bringt sie somit zum Platzen. Die Tubes wurden erst geschüttelt, um eventuell vorhandene Blutklumpen aufzulösen, und dann 10 min auf eine Horizontalwippe gelegt. Anschließend wurden die Tubes 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde das Erythrozytenlysat von den Pilz- und anderen Blutzellen getrennt und danach als rötlicher Überstand abgegossen. Das am Boden festsitzende Pellet, in dem die Pilz-DNA enthalten ist, wurde durch kräftiges Reiben des Tube-Bodens über ein Gitter aufgerüttelt. Erneut wurden etwa 45 ml RCLB in die Tubes gefüllt und die Erythrozytenlyse wiederholt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des RCLB

Inhaltsstoffe	Konzentration
Tris pH 7,6	10 mM
Magnesiumchlorid	5 mM
Natriumchlorid	10 mM
Aqua bidest	

Nach dem Autoklavieren Lagerung bei 4°C.

Im nächsten Schritt wurden die Leukozyten aufgelöst, indem das erneut aufgeriebene Pellet mit 1 ml WCLB (White Cell Lysis Buffer) vermengt wurde, und dieser Ansatz 45 min lang bei 65°C im Wasserbad inkubiert wurde.

Die im WCLB enthaltene Proteinase K wird aus Tritirachium album isoliert. Sie weist im Gegensatz zu anderen Endopeptidasen keine Spezifität für bestimmte Aminosäuresequenzen auf und wird nicht durch Metall-Ionen oder Chelatbildner wie z. B. EDTA inhibiert. Unter Zugabe von SDS wird eine höhere Proteaseaktivität, d.h. eine Zersetzung der Proteine bis hin zu den einzelnen Aminosäuren, erreicht (50).

Während der Inkubation wurden die Membranen der Leukozyten, zum Teil auch die der Pilzzellen, lysiert. Anschließend wurden die Proben 10 min, diesmal bei 5000 U/min, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wieder aufgerüttelt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des WCLB

Inhaltsstoffe	Konzentration
Tris pH 7,6	10 mM
EDTA	10 mM
Natriumchlorid	50 mM
SDS	0,2 %
Proteinase K	200 µg/ml

Nach der Sterilfiltration Lagerung bei -20°C .

Für den nächsten Arbeitsschritt wurden 500 µl einer Lytikase-Lösung in die Tubes pipettiert, diese nach dem vortexen bei 37°C 45 min im Wasserbad inkubiert und danach wieder 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Wie oben wurde auch dieses Pellet nach dem Abschütten des Überstandes aufgerieben.

Dieses Enzym wurde ursprünglich aus *Arthrobacter luteus* isoliert, wird aber heute wie viele Enzyme rekombinant in *E.coli* hergestellt und wurde als solches auch in dieser Arbeit verwendet. Die Lytikase hydrolysiert Glucose-Polymere mit β -1,3 Bindung wie z.B. Glucan, ein Bestandteil der Hefezellmembran (50). Dadurch erreicht man die Umwandlung der Pilzzellen in sogenannte Sphäroplasten, das sind Pilzzellen mit angedauter, instabiler Zellwand, die dann leichter zu lysieren ist.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Lytikase-Lösung

Inhaltsstoffe	Konzentration
Tris pH 7,6	50 mM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoethanol	0,2 %
Rekombinante Lytikase	1U/100µl
Aqua bidest	

Nach der Sterilfiltration Lagerung bei -20°C .

Man könnte annehmen dass, die Extraktion aus Plasma einfacher sei als aus Vollblut, leider ist dies aber mit einem Sensitivitätsverlust verbunden, da die Pilzzellen beim

Zentrifugieren zur Erstellung des Plasmas mit den Blutzellen im Pellet verbleiben, und nur die freie Pilz-DNA im Plasma nachgewiesen werden kann (87).

Die DNA-Extraktion aus der bronchoalveolären Lavage wurde ähnlich wie die aus Vollblut gehandhabt. Die Proben wurden nicht in RCLB, sondern zweimal 45min in 2ml WCLB inkubiert.

2.2.2.2. Extraktion mit Triton X 100

Mit dem Ziel die Extraktion ohne Sensitivitätsverlust zu verkürzen, wurde versucht die Erythrozyten und die Leukozyten in einem Arbeitsschritt zu lysieren. Damit könnte etwa eine Stunde eingespart werden. Zu diesem Zweck wurde dem RCLB in einem Verhältnis von 1:100 Triton X 100 zugesetzt, und diese Mischung zur Erythrozytenlyse bei einer in Probandenblut inokulierten Verdünnungsreihe verwendet (siehe unter 2.2.1.). Die Proben wurden nicht in WCLB, sondern gleich in Lytikase inkubiert. Weitere Arbeitsschritte wie unter (siehe unter 2.2.2.1.).

2.2.2.3. Extraktion mit Saponin

Auch bei diesem Versuchsansatz war das Ziel die WCLB-Inkubation auszulassen. Hierzu wurde dem RCLB ebenfalls in einem 1:100-Verhältnis Saponin (aus Quillaja-Algen) beigemischt, und eine mit Probandenblut vermengte Verdünnungsreihe (siehe unter 2.2.1.) wie unter 2.2.2.1. ohne WCLB, direkt mit Lytikase weiterextrahiert.

2.2.2.4. RCLB-Ansatz in 2ml-Eppendorf-Cups

In der Hoffnung mit einer größeren Zentrifugalkraft (13.000 U/min) weniger Pilz-DNA mit dem Überstand zu verwerfen und damit die Sensitivität zu steigern, wurde jeweils 1 ml einer wie unter 2.2.1. beschrieben erstellten Verdünnungsreihe statt in Falcon-Tubes in 2ml Eppendorf-Cups übertragen und im Verhältnis 1:1 mit dem RCLB vermischt. Statt der Horizontalwippe kam das Vortex-Gerät 10 min lang zum Einsatz. Weiteres Verfahren wie unter 2.2.2.1..

2.2.2.5. WCLB-Ansatz in 2ml-Eppendorf-Cups

Bei dem oben beschriebenen Versuchsansatz konnten nur jeweils 1 ml der Blutproben verwendet werden. Dabei kann eine beginnende Infektion eventuell übersehen werden, da die nur vereinzelt im Blut vorhandenen Pilzzellen nicht mit diesem einen ml aufgenommen werden. Um aber trotzdem die größere Zentrifugalkraft (13.000 U/min) zu nutzen, wurde die Erythrozytenlyse wie unter 2.2.2.1. in Falcon-Tubes durchgeführt, und dann die Proben nach der WCLB-Inkubation in 2ml-Eppendorf-Cups übertragen und wie unter 2.2.2.1. beschrieben weiterbehandelt.

2.2.2.6. Probenvolumen

Um zu überprüfen, ob sich ein kleineres Probenausgangsvolumen auf die Sensitivität auswirkt wurden die Proben einer in Probandenblut okultierten Verdünnungsreihe (siehe unter 2.2.1.) in ungleiche Volumina (500µl versus 4,5ml) aufgeteilt und jeweils in RCLB aufgenommen und wie unter 2.2.2.1. beschrieben weiter extrahiert. Anschließend wurden die beiden Verdünnungsreihen in einem PCR- und einem Elisa-Ansatz (s.2.2.4.) weiter verarbeitet.

2.2.3

Aufreinigung des Extraktionsproduktes

Nach der Extraktion befinden sich noch Zelltrümmer im Pellet. Diese störenden Substanzen müssen entfernt werden. Zur Aufreinigung des Extraktionsproduktes können verschiedene Kits verwendet werden, die alle auf einem ähnlichen Prinzip beruhen. Zunächst wird die DNA ausgefällt, so dass sie an eine Trägersubstanz gebunden werden kann. Die restliche Flüssigkeit und damit auch die Verunreinigungen werden durch Spülung entfernt und anschließend die gereinigte DNA aufgefangen. Es wurden verschiedene Extraktionskits miteinander verglichen. Leider sind die Bestandteile der Pufferlösungen nicht von allen Kits bekannt.

2.2.3.1.

Qiagen Kit

Nach dem Aufreiben des Pellets (siehe unter 2.2.2.1.) wurden 180 µl ATL-Puffer (Tissue Lysis Buffer) von oben und 20 µl Proteinase K direkt in die Flüssigkeit aufpipettiert, vermischt und für 20 min bei 56°C inkubiert.

Durch den ATL-Puffer werden die Sphäroplasten vollständig lysiert und die Proteinase K zerkleinert die übriggebliebenen Zellbestandteile. Somit liegt die DNA frei.

Anschließend wurden 200 µl AL-Puffer (Lysis Buffer) dazugegeben und die Proben nach dem vortexen 10 min lang bei 70°C ins Wasserbad gestellt.

Der AL-Puffer enthält chaotrope Salze, die später für die DNA Bindung benötigt werden. Doch zunächst musste die freie DNA mit 210 µl 99,8% Ethanol ausgefällt werden. Der gesamte Probeninhalt wurde dann mit einer 1000 µl-Pipette entnommen und auf ein Qiagensäulchen übertragen. Die Säule enthält eine Silicamembran, die in Gegenwart chaotroper Salze (AL-Puffer) die ausgefällte DNA zu fixieren vermag. Das Säulchen wurde in ein Auffanggefäß gesteckt und 1 min bei 9000 U/min zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde verworfen und die Säule in ein neues übertragen. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 500 µl AW1- bzw. AW2-Puffer, bei denen die an die Membran fixierte DNA durch Zentrifugation (1. Schritt: 1 min bei 9.000 U/min,

2.Schritt: 3 min bei 13.000 U/min) von den restlichen Verunreinigungen getrennt wurde. Dazu wurden jeweils frische Auffanggefäße verwendet. Die Lösung der DNA von der Silicamembran erfolgt durch pH-Erhöhung. Ähnlich wie bei den Waschschritten wurden dazu zwei Eluationsschritte mit jeweils 50 µl AE-Puffer durchgeführt. Die Säulen wurden davor auf Eppendorf-Cups übertragen, die den AE-Puffer zusammen mit der gereinigten DNA während der Zentrifugation (1. Schritt: 1min bei 9.000 U/min 2. Schritt: 1 min bei 13.000 U/min) auffing.

2.2.3.2. High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)

Das High Pure PCR Template Preparation Kit basiert auf dem gleichen Prinzip wie das Qiagen Kit. Zu den extrahierten Proben wurden 200 µl Bindepuffer von oben und 40 µl Proteinase K direkt unten in die Flüssigkeit pipettiert und nach dem vortexen 10 min bei 72°C inkubiert.

Tabelle 4:Zusammensetzung des Bindepuffers

Inhaltsstoffe	Konzentration
Guanidinium-HCl	6 M
Harnstoff	10 mM
Tris-HCl pH 4,4	10 mM
Triton-X-100	20 %

Nach der Inkubation wurden 100 µl Isopropanol hinzugefügt und vermischt. Der gesamte Inhalt wurde mit einer 1000 µl-Pipette entnommen und auf ein High Pure Filter-Tube, das die Silicamembran enthält, aufgetragen und 1 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Auch hier wurden für jede Zentrifugation neue Auffanggefäße verwendet. Die gebundene DNA wurde zweimal mit 500 µl Waschpuffer (1 min bei 8.000 U/min; 2.Schritt anschließend 10 sec bei 13.000 U/min) gespült.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Waschpuffers

Inhaltsstoffe	Konzentration
NaCl	20 mM
Tris-HCl pH 7,5	2 mM

Anschließend wurden die Säulchen auf Eppendorf-Cups übertragen und zweimal mit je 100 µl auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffer gespült (Zentrifugation wie beim Waschpuffer).

Tabelle 6: Zusammensetzung des Elutionspuffers

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris, pH 8,5	10 mM

2.2.3.3. E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (peq lab)

Auch bei diesem Kit wird die selbe Methode angewendet, allerdings bei höherer Zentrifugation. Der Lytikaseansatz wurde deshalb in Eppendorf-Cups übertragen. Das Pellet wurde in 350 µl Isopropanol gelöst, gut vermischt und 2 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Cups 1 min umgedreht auf saugfähigem Papier getrocknet. Nacheinander wurden 150 µl FG3-Puffer und 300 µl 96% Ethanol in die Proben gegeben und gevortext. Die Flüssigkeit wurde mit einer 1.000 µl-Pipette in eine HiBind-Mini-Säule (Silicamembran) übertragen und 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Die Flüssigkeit floss bei jeder Zentrifugation in ein neues Auffanggefäß ab. Zwei Waschgänge, mit je 750 µl DNA-Waschpuffer (1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert) wurden durchgeführt. Zwischen dem waschen und der Elution wurde die Membran 2 min lang durch Zentrifugieren bei 13.000 U/min getrocknet. Das Lösen der DNA von der Silicamembran wurde durch zweimaliges

Waschen mit je 100 µl auf 65°C vorgewärmten Ampuwa erreicht. Vor dem Zentrifugieren (1 min bei 11.000 U/min) wurden die Proben jeweils 1 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.4. peqGOLD GelPure™ Kit

In diesem Kit lag das Silica nicht als Membran, sondern als Suspension vor, die zusammen mit dem Bindepuffer zum Extraktionsprodukt gegeben und vermengt wurde. Auch hier wurde der Lytikase-Ansatz vorher in Eppendorf-Cups überführt. 5 min lang wurden die Proben bei Raumtemperatur inkubiert. Durch hohe Zentrifugation (30 sec bei max. Geschwindigkeit = 13.200 U/min) wurde die DNA als Pellet am Boden des Gefäßes gehalten, während der Überstand abgeschüttet wurde. Die beiden Waschdurchgänge mit je 400µl Waschpuffer wurden ebenfalls 30 sec lang bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert und die Überstände verworfen. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden kleine Flüssigkeitsreste mit einer Pipette abgenommen und die Pellets etwa 15 min bei 37°C im Heizblock getrocknet (Auch nach längerem zuwarten wurden die Pellets nicht ganz trocken). Das Lösen der DNA erfolgte auch bei diesem Ansatz durch pH-Änderung. Auf das trockene Pellet wurden wieder in zwei Schritten jeweils 50µl TE-Puffer (pH 8, auf 55°C vorgeheizt) pipettiert, vermischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Silicapartikel abzentrifugiert (1 min bei max. Geschwindigkeit) und die dann freie DNA in ein neues Gefäß überführt.

Die Silica Suspension reichte leider nur für 4 Proben aus.

2.2.3.5.

peqGOLD DNAPure™PT

Auch bei diesem Kit musste mit Eppendorf-Cups gearbeitet werden. Das Pellet (siehe unter 2.2.2.1.) wurde zunächst in 500µl PT-Puffer gelöst, vorsichtig vermischt (nicht gevortext), und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kit kommt ohne DNA-Bindung aus. Durch Zugabe von 750µl Chloroform, anschließendem Schütteln (die Phasen konnten nicht gut vermischt werden), einer fünf minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation (10 min bei 12.000 U/min) wurden unlösliche Debris in der unteren Phase von der DNA im Überstand getrennt. Dieser wurde in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde mit 1125µl 96% Ethanol ausgefällt indem die Proben wieder gut vermischt 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 4 min bei 8.000 U/min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aufgerüttelt. Zum Waschen wurde eine PT-Puffer-Ethanol-Waschlösung (1.500µl) im Verhältnis 1:¾ und 150µl Ampuwa verwendet. Nach dem Mischen wurden die Cups 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 4 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet durch rütteln gelöst. Der Waschdurchgang wurde zweimal durchgeführt. 1.500µl 75% Ethanol wurden anschließend mit den Proben vermischt und nach der fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur 4 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entnommen und die Proben 2 min auf saugfähigem Papier getrocknet. Während einer vierminütigen Zentrifugation bei 12.000 U/min wurde die DNA in 50µl 8 mM NaOH gelöst. Auch dieser Vorgang wurde wiederholt und der Überstand jeweils in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Das war leider nicht ganz einfach, weil das Pellet, das verworfen werden sollte, schlecht vom Überstand abzugrenzen war. Zum Schluss sollte der pH mit 10µl 100 mM HEPES auf 8 eingestellt werden.

2.2.4.

PCR

Nach der Aufreinigung wurden die Proben in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Das bedeutet, das nachzuweisende Gen wird mehrfach kopiert, so dass es mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden wie Gelelektrophorese oder Elisa quantifiziert werden kann. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich eine hochkonservierte Sequenz aus der 18S Untereinheit der ribosomalen RNA der Pilze amplifiziert. Diese Sequenz wurde durch Mutation kaum modifiziert, so dass sie nahezu in allen Pilzarten noch in ihrer Urform zu finden ist, und somit die Detektion und die Identifizierung von Pilzen aus einem breiten Spektrum erlaubt.

Da Aspergillussporen ubiquitär in der Luft vorhanden sind sollte die PCR, um vor allem aerogene Kontaminationen zu vermeiden, unter sterilen Bedingungen und von der Extraktion und der Detektion räumlich getrennt durchgeführt werden, das bedeutet, Benutzen von eigens für die PCR, wie auch für jeden anderen Arbeitsschritt, vorgesehener steriler Ausrüstung (Pipetten und sterile, mit Filtern versehene Spitzen) unter der Sterilbank, tragen von sterilen Handschuhen, Mundschutz und Einmalkittel, und UV-Bestrahlung sämtlicher Lösungen (30 min bei 312nm) (85, 86, 87). Um Kontaminationen sofort zu erkennen, wurden bei jedem Arbeitsschritt (Extraktion, PCR, Elisa und Light Cycler-Lauf) je zwei oder mehr Negativproben (destilliertes Wasser) mitgeführt. Um die Funktion der PCR und des Elisas beurteilen zu können, wurden bei diesen Arbeitsschritten eine Positivprobe oder gar eine Verdünnungsreihe mitgeführt. Nur wenn diese Proben positiv waren und die Negativproben kein Ergebnis erbrachten wurde der Lauf als valide erklärt.

Zur Amplifizierung wurden 10 µl des Extraktionsproduktes in PCR-Tubes vorgelegt, mit 40 µl PCR-Mix vermischt und in ein PCR-Thermostat gesteckt.

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR.Mixes

Inhaltsstoffe	Konzentration	µl / Probe
Aqua bidest		27,2
10fach PCR-Puffer	siehe Tabelle 8	5
MgCl ₂	1mM	2
dig-dNTP	je 0,5 mMol	5
Fung 1+2	je 50 pMol	0,5
Taq-Polymerase	1,5 U	0,3

Tabelle 8: Zusammensetzung des 10xPuffers

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris, pH 9,5	100 mM
Natriumchlorid	500 mM
Magnesiumchlorid	100 mM
BSA (bovine serum albumin)	1 mg/ml

Tabelle 9: Primerpaar

Fung 1	5' ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'

Lagerung bei -20°C.

Das Primerpaar legt die beiden Enden der etwa 500 bp langen zu amplifizierenden Gensequenz fest. Die Desoxynucleosid-triphosphate (dNTPs) oder Nucleotide sind die vier Bausteine der DNA. Die DNA-Polymerase ist ein hitzebeständiges Enzym, das die einzelnen dNTPs zu neuen DNA-Strängen verknüpft.

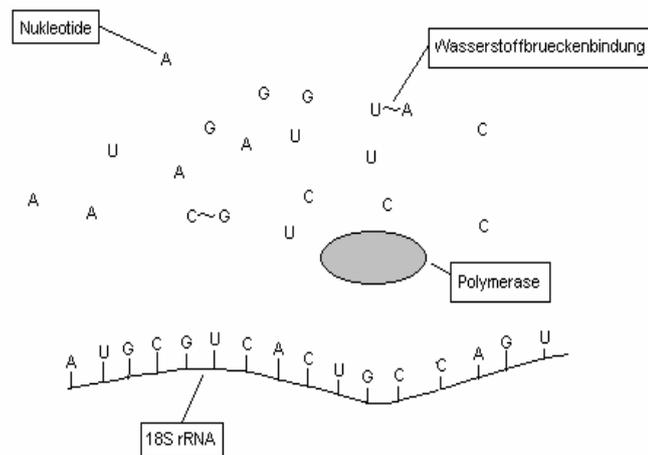


Abbildung 1 : Die PCR

Im Thermostat wird die DNA sich mehrfach wiederholenden Temperaturprofilen ausgesetzt.

Tabelle 10: Temperaturprofil

34 Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	4
Denaturierung	94	1/2
Annealing	62	1
Extension	72	2
Terminale Extension	72	5

Die einzelnen Zyklen sind in drei Phasen eingeteilt. In der Denaturierungsphase lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den RNA-Strängen und den dNTPs, somit werden diese voneinander getrennt.

Die Primer (etwa 20 bp lange, zur Gensequenz komplementäre Oligonukleotide) können dann in der Annealingphase mit den RNA-Strängen hybridisieren und somit die Enden der Zielsequenz festlegen. Hinter den Primern lagern sich die einzelnen dNTPs

In der darauffolgenden Denaturierungsphase wird der neue DNA-Strang vom RNA-Strang gelöst und beide stehen als Matrizen-Stränge zur weiteren Vervielfältigung, diesmal jeweils mit dem anderen Primer und damit in der umgekehrten Richtung, zur Verfügung. Diese Zyklen wiederholen sich beliebig oft, so dass immer mehr gleich lange Gensequenzen entstehen. Diese können dann z. B. in der Gelelektrophorese dargestellt werden.

2.2.4.1. Primer

2.2.4.1.1. Asp sp. + Fung 2

Zunächst wurde aus einer extrahierten *Aspergillus fumigatus*-Konidiensuspension (10^6 CFU) eine Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden in 6 Cups je 90 µl Ampuwa gegeben. Aus dem 10^6 CFU-Extraktionsprodukt wurden dann 10 µl entnommen und im ersten der 6 Cups mit den 90 µl Ampuwa vermischt. Von diesem 10^5 CFU-Standard wurden dann wieder 10 µl in das nächste Cup übertragen. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis eine Verdünnungsreihe von 10^6 - bis 10^0 CFU angefertigt war. Außerdem wurden je eine *Candida glabrata*- und *-tropicalis*-Probe mit amplifiziert.

Das Primerpaar fung 1+2 bindet, wie schon unter 2.2.4. erwähnt, an einem hochkonserviertem Abschnitt eines 18S rRNA Genes. Dieses Gen kommt in vielen Pilzen vor. Um die Spezifität zu erhöhen kann man den fung 1-Primer gegen einen aspergilluspezifischen Primer austauschen. Dieser Primer hybridisiert mit einem variablen Abschnitt des hochkonservierten Genes. Mit dieser Primerkombination sollen vorwiegend Aspergilluspezies detektiert werden können.

Tabelle 11: PCR-Mix mit Asp sp-Primer

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (μ l)
Aqua bidest		26,7
10fach PCR-Puffer		5
MgCl ₂	1mM	2
dig-dNTP	200	5
Asp. sp.	50 pmol	0,5
Fung 2	50 pmol	0,5
Taq-Polymerase	2,5 U	0,3

Tabelle 12: Asp sp-Primer

Asp. sp	5' CGC CTC ACC GCG AGT ACT 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'

Lagerung bei -20°C

Tabelle 13: Temperaturprofil mit Asp sp-Primer

34 Zyklen	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	4
Denaturierung	94	1/2
Annealing	62	1
Extension	72	2
Terminale Extension	72	5

Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, anhand derer nicht nur die Sensitivität dieses PCR-Ansatzes, sondern auch die Qualität der Elektrophorese begutachtet wurde. Die spezifische Bande, die das Amplifikat darstellte, sollte deutlich zu erkennen sein, weitere unspezifische Banden, Schlierenbildung, Primerdimere oder

Primerwolken galt es durch entsprechende Variierung der Primerkonzentration, der Zyklenanzahl oder der Annealingtemperatur zu vermeiden.

Humane DNA kann die Detection eines schwachen DNA-Signales in einem Agarosegel verschleiern (140)

2.2.4.1.2. C.alb sp. + Fung 2

Analog zu 2.2.4.1.1. wurde hier statt dem Fung 1 Primer ein spezifischer Candida albicans Primer verwendet.

Tabelle 14: PCR-Ansatz mit Cal sp-Primer

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (µl)
Aqua bidest		25,7
10fach PCR-Puffer		5
MgCl ₂	1 mM	2
dig-dNTP	200	5
Cal. sp.	50 pmol	1
Fung 2	50 pmol	1
Taq-Polymerase	2,5 U	0,3

Tabelle 15: Cal sp-Primer

Cal. sp	5' GTA GCC ATT TAT GGC GAA CC 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'

Tabelle 16: Temperaturprofil mit Cal sp-Primer

34 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	4
Denaturierung	94	1/2
Annealing	62	1
Extension	72	2
Terminale Extension	72	5

2.2.4.1.3. Aspspez 1 + 2: *Aspergillus fumigatus* retrotransposon

Um die Spezifität noch weiter zu erhöhen kann man auch als Rückwärtsprimer einen speziesspezifischen Primer verwenden.

Tabelle 17: PCR-Ansatz mit Asp spez-Primer

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (μ l)
Aqua bidest		27,2
10fach PCR-Puffer		5
MgCl ₂	1 mM	2
Dig-dNTP	200	5
Primer 1+2	Je 50 pmol	0,25
Taq- Polymerase	2,5 U	0,3

Tabelle 18: Asp spez-Primer

Aspspez 1	5' GCC TTC ATG ACG TCC GAT 3'
Aspspez 2	5' GAT GTT CGA GAA GTC CCC 3'

Tabelle 19: Temperaturprofil mit Asp spez-Primer

41 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	4
Denaturierung	94	1/2
Annealing	55	1
Extension	72	2
Terminale Extension	72	5

2.2.4.2.

Multiplex-PCR

Im nächsten Schritt wurde eine sogenannte Multiplex PCR gestartet, also beide spezifischen Vorwärtsprimer und den Rückwärtsprimer Fung 2 verwendet.

Mit dieser PCR kann man somit mehrere spezifische Erreger detektieren.

Theoretisch könnte man die Pilze sogar im Gel unterscheiden, in der Praxis hat sich jedoch gezeigt, dass die DNA-Fragmente ungefähr gleichlang waren, und die Banden damit nicht zu unterscheiden waren.

Tabelle 20: PCR-Ansatz der Multiplex-PCR

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (μ l)
Aqua bidest		25,9
10fach PCR-Puffer		5
MgCl ₂	1 mM	2
dig-dNTP	200	5
Asp sp.	50 pmol	0,25
Cal. sp.	50 pmol	0,25
Fung 2	50 pmol	0,5
Taq-Polymerase	2,5 U	0,3
Anti-Taq	2,5 U	0,8

Anti-Taq ist ein Antikörper der die Polymerase vor Beginn der PCR inhibiert. Man verspricht sich davon die Spezifität erhöhen zu können, denn vor der PCR binden die Nucleotide und die Primer teilweise unspezifisch an der Matrizen-RNA. Durch die Inhibierung der Polymerase vor Beginn der PCR kann die Extension dieser Bindungen verhindert werden. Im Gel werden die Banden sauberer abgrenzbar. Durch das 9 minütige Erhitzen der Proben auf 94 °C werden die Antikörper von der Polymerase abgespalten und das Enzym kann seine Arbeit verrichten.

Tabelle 21: Primer der Multiplex-PCR

Asp. sp	5' CGC CTC ACC GCG AGT ACT 3''
Cal. sp	5' GTA GCC ATT TAT GGC GAA CC 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'

Tabelle 22: Temperaturprofil der Multiplex-PCR

41 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	9
Denaturierung	94	1/2
Anealing	55	1
Extension	72	2
Terminale Extension	72	5

2.2.4.3. Nested PCR

Die Sensitivität kann auch durch die Erhöhung der Zyklen-Anzahl gesteigert werden. Allerdings verhält sich die Aktivität der Polymerase umgekehrt proportional zur Zyklen-Anzahl. Man kann die Zyklen-Anzahl auch erhöhen, indem man mit einem oder zwei µl des ersten PCR-Produktes und 9 bzw. 8 µl Ampuwa eine zweite PCR mit neuem Mix und damit mit frischer Polymerase ansetzt.

2.2.4.3.1.

Taq-Polymerase

1.PCR

Die erste PCR wurde wie in den Tabellen zu ersehen angesetzt.

Tabelle 23: PCR-Ansatz einer nested PCR

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (μ l)
Aqua bidest		33,2
10fach PCR-Puffer		5
dNTP	200	1
Fung 1+2	Je 50 pmol	0,5
Taq-Polymerase	2,5 U	0,3

Tabelle 24: Primer für die nested-PCR

Fung 1	5' ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'

Tabelle 25: Temperaturprofil der nested-PCR

30 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	4
Denaturierung	94	1/2
Annealing	62	1
Extension	72	2
Terminale Extension	72	5

2.PCR

Von diesem PCR-Produkt wurde jeweils 1 µl entnommen, in jeweils 9 µl Ampuwa aufgenommen und mit neuem Mastermix vermenget. Mastermix, Primer und PCR-Programm wurden wie bei der 1. PCR angewendet.

2.2.4.3.2. Pfu-Polymerase

Die Pfu-Polymerase (gewonnen aus dem thermostabiles Bacterium *Pyrococcus furiosus*) weist bei häufiger Zyklen-Wiederholung oder bei langen Amplifikaten gegenüber der Taq-Polymerase (*Bacterium Thermus aquaticus*) eine geringere Fehlerrate auf. Somit entstehen weniger fehlerhafte DNA-Stänge, und damit auch weniger unspezifische Banden im Gel. Dadurch erhofft man sich die Spezifität steigern zu können. Aber die Wahl der Polymerase hat auch Auswirkungen auf die Sensitivität. Wenn die Polymerase in der Primerregion nicht genau arbeitet und dort eine Mutationen in den neuen Strang einbaut wird, dann können von diesem Strang ausgehend keine weiteren DNA Stränge amplifiziert werden. Dies spielt eigentlich nur eine Rolle, wenn in der Probe nur wenig DNA-Material vorliegt, was aber z. B. zu Beginn einer Infektion der Fall ist.

Außerdem duldet die Pfu-Polymerase höhere Temperaturen, was bei der Denaturierung cytosin- und guaninreicher Ziel-DNA von Bedeutung ist, denn zwischen diesen beiden Basen halten jeweils 3 Wasserstoffbrückenbindungen die beiden Stränge zusammen.

1.PCR

Tabelle 26: PCR-Ansatz mit Pfu-Polymerase

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (μ l)
Aqua bidest		32
cloned Pfu-buffer		5
dNTP	200	0,5
Fung 1+2	Je 50 pmol	1,5
Pfu-Polymerase	2,5 U	1

Tabelle 27: Zusammensetzung des cloned Pfu buffers

Inhaltsstoffe	Konzentration
Tris-HCL (pH 8,8)	200 mM
MgSO ₄	20 mM
KCl	100 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
1 % Triton X-100	
BSA, nucleasefrei	1 mg/ml

Tabelle 28: Primer der Pfu-PCR

Fung 1	5' ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'

Tabelle 29: Temperaturprofil der Pfu-PCR

30 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	5
Denaturierung	94	1/2
Annealing	62	1
Extension	72	1
Terminale Extension	72	9

2.PCR

Neuer PCR-Ansatz mit 2 µl DNA und 8 µl Ampuwa,.

Tabelle 30: 2. nested-PCR-Ansatz

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (µl)
Aqua bidest		32
cloned Pfu-buffer		5
dNTP	200	0,5
Fung 1+2	Je 50 pmol	1,5
Pfu-Polymerase	2,5 U	1

Tabelle 31: Primer des 2. nested-PCR-Ansatzes

Fung 1	5' ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'

Tabelle 32: Temperaturprofil des 2. nested-PCR-Ansatzes

41 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	5
Denaturierung	94	1/2
Annealing	62	1
Extension	72	1
Terminale Extension	72	9

2.2.4.3.3. AmpliTaq Gold -Polymerase

Eine weitere Spezifitätsverbesserung erreicht man durch eine sogenannte Hot-Start PCR.

Dabei wurde Gold-Taq-Polymerase verwendet, die vor Beginn der PCR noch durch Antikörper blockiert ist. In jedem PCR-Ansatz binden die Primer noch vor Beginn der PCR unspezifisch an die DNA. Durch die noch blockierte Polymerase können diese ungewollte Hybride nicht weiter elongiert werden. Die Taq wird dann zu Beginn der PCR durch hohe Temperatur entblockt (9 min lang bei 95 °C).

1.PCR

Tabelle 33 : PCR-Ansatz mit Gold-Taq-Polymerase

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (μ l)
Aqua bidest		25,75
10fach PCR-Puffer		5
MgCl ₂	1 mM	8
Dig-dNTP	200	0,6
Fung 1+2	Je 50 pmol	0,4
Ampli- Taq-Gold- Polymerase	5U/ μ l	0,25

Tabelle 34: Primer des Gold-Taq-Ansatzes

Fung 1	5' ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'

Tabelle 35: Temperaturprofil des Gold-Taq-Ansatzes

25 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	95	9
Denaturierung	95	1/2
Annealing	63	1
Extension	72	1/2
Terminale Extension	72	6

2.PCR

Wieder wurde 1 µl mit 9 µl Ampuwa vermischt und ein neuer PCR-Lauf angesetzt.

Tabelle 36: 2. Gold-Taq-Ansatz

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (µl)
Aqua bidest		25,75
10fach PCR-Puffer		5
MgCl ₂	1 mM	8
Dig-dNTP	200	0,6
NES 1+2	100pmol/	0,4
Ampli-Taq-Gold-Polymerase	5U/µl	0,25

Tabelle 37: Primer des 2. Gold-Taq-Ansatzes

NES 1	5' ATA GCG TAT ATT AAA GTT GTT GC 3'
NES 2	5' GGT TAA GAC TAC GAC GGT ATC 3'

Tabelle 38: Temperaturprofil des 2. Gold-Taq-Ansatzes

36 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	95	9
Denaturierung	95	1/2
Annealing	60	1
Extension	72	2
Terminale Extension	72	5

2.2.5.

Quantifizierung

2.2.5.1.

DIG-labeling PCR-Elisa

Zunächst wurden die extrahierten Proben in einer Polymerase Ketten-reaktion amplifiziert. Dazu wurde das Boehringer-Mannheim –Kit verwendet. In das Dig-labeling-PCR-Produkt wurde während der Amplifizierung Digoxigenin mit eingebaut, indem für diese PCR Uracil-Nukleotide verwendet wurden, die an Digoxigenin gebunden waren (Dig- dUTP). Somit wurde immer dort, wo im Zielgen Arginin stand, im PCR-Produkt entweder Thymin oder Uracil mit Digoxigenin in die Amplifikate eingebaut. Dieses Digoxigenin konnte später im ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay) über eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden.

Tabelle 39: PCR-Ansatz für Elisa

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (µl)
Aqua bidest		27,2
10fach PCR-Puffer		5
MgCl ₂	1 mM	2
dig-dNTP	200	5
Fung 1+2	Je 50 pmol	0,5
Taq-Polymerase	2,5 U	0,3

Tabelle 40: Primer für PCR-Elisa

Fung 1	5' ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'

Tabelle 41: Temperaturprofil für PCR-Elisa

34 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	4
Denaturierung	94	1/2
Annealing	62	1
Extension	72	2
Terminale Extension	72	5

Dazu wurden die DNA-Stränge des PCR-Produktes (20 µl) während einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur durch 20 µl Denaturierungslösung (NaOH) voneinander getrennt um die Hybridisierung mit der spezifischen, mit Biotin markierten Sonde zu ermöglichen. Die Sonde wurde in einer Hybridisierungslösung im Verhältnis 1/1.000 angesetzt (die Hybridisierungslösung der Candida-Sonde sollte 30 % DMSO enthalten) und dann 200 µl/Probe zur denaturierten DNA pipettiert und gevortext, so konnte die spezifische Sonde an der denaturierten DNA (variable Region des 18 S rRNA-Genes) binden.

Tabelle 42: Sonden für PCR-Elisa

A. fumigatus	5' TGG GGA ACC TCA TGG CCT TCA CTG GCT GTG 3'
Candida	5' TCT GGG TAG CCA TTT ATG GCG AAC CAG GAC 3'

Von diesen Ansätzen wurden 200 µl in je ein well einer Microtiter plate (MTL) übertragen. An den Wänden dieser wells war Streptavidin fest adsorbiert. Die wells wurden dann mit einer Schutzfolie zugeklebt und die Platte für 2 ½ bis 3 Stunden in einem Brutschrank (40°C) inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Amplifikate an der Wand des Gefäßes fixiert. Durch permanentes Schütteln der Platte auf einem Vortexer wurde die Anlagerung der Biotin-markierten Sonde an das

Streptavidin verbessert. Die Dauer der Inkubation ermöglicht die bessere Unterscheidung zwischen positiven und negativen Proben (85).

Paralell dazu wurden interne ELISA-Kontrollreaktionen durch den Einsatz von digoxigeninmarkierter humaner Kontroll-DNA durchgeführt. Diese wurde in den Verdünnungen 1:1, 1:10 und 1:100 eingesetzt und mit einer biotinmarkierten Kontrollsonde detektiert.

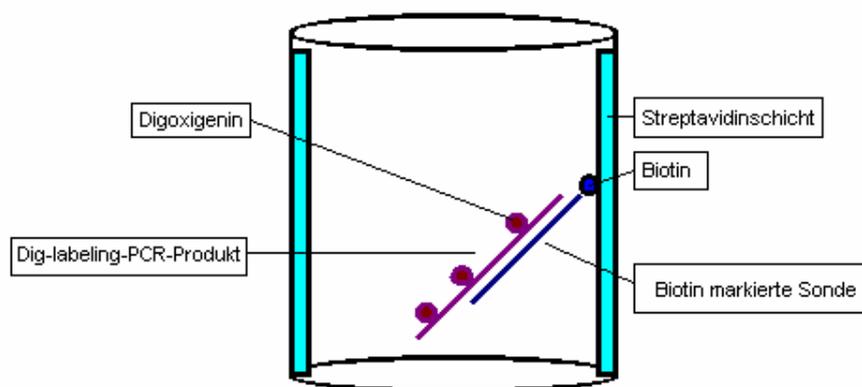


Abbildung 4: PCR-Elisa

Nach dieser Inkubation wurden die nicht gebundenen Anteile mit 3*200 µl auf 40°C vorgewärmte Waschlösung, übertragen mit einer multi-channel-Pipette, ausgewaschen. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Peroxidase (POD) markierte Anti-Dig-Antikörper dazu pipettiert und über einen Zeitraum von 30 min abgeklebt im Inkubationsschrank geschüttelt. Die Antikörper binden an das Digoxigenin, das im PCR-Produkt eingebaut wurde.

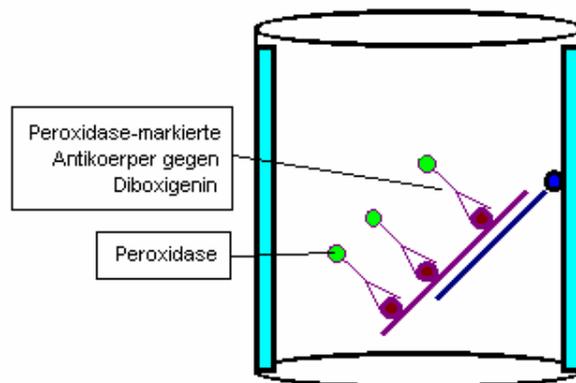


Abbildung 5: Antikörperanlagerung beim PCR-Elisa

Die ungebundenen Antikörper mussten natürlich gründlich ausgewaschen werden, da sie auch ohne an Digoxigenin gebunden zu sein eine Farbreaktion bewirkt hätten. Daher wurde nach dem Auskippen der Platte 6x mit 250 µl vorgewärmter Waschlösung gewaschen. Danach wurden 200 µl ABTS-Färbelösung in die wells pipettiert. Diese zum Markierungsenzym passende Substratlösung enthält 2,2-Azino-di-3-Ethylbenzthiazolin. Die Enzym-Substrat-Reaktion zwischen dem ABTS und der Peroxidase konnte nach einer erneuten Inkubationszeit von 25 min im dunklen Brutschrank (40°C, abgeklebt und im Vortexer eingespannt) anhand einer Farbreaktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm und einem Referenzfilter von 492 nm gemessen werden.

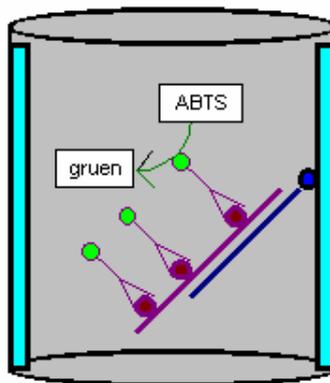


Abbildung 6: Farbreaktion beim PCR-Elisa

2.2.5.2.

Gelelektrophorese

Elektrisch geladene Makromoleküle, zu diesen gehört die DNA, lassen sich durch ein elektrisches Feld trennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Nettoladung, die Molekülgröße, die -form sowie durch die angelegte Spannung bestimmt. Die negativ geladene DNA wandert also zur Anode. Als Trägermaterial wurde ein Agarose-Gel verwendet. Dieses Gel wurde hergestellt aus Agarose, Wasser, 2% TAE-Puffer (zur Verbesserung der Leitfähigkeit des Geles) und Gelstar (zum Anfärben der DNA).

Tabelle 43: Zusammensetzung des 50 x TAE-Puffers

Inhaltsstoffe	Konzentration
Tris pH 7,6	2 M
Essigsäure 96%	2 M
EDTA	0,1 M

Zuerst wurden 2 g Agarose, 10 ml TAE-Puffer und 90 ml Wasser in der Mikrowelle 3 min bei 600 Watt zum kochen gebracht. Wenn sich die Agarose noch nicht richtig gelöst hat wurde destilliertes Wasser bis zur 100 ml Markierung zugegeben und noch einmal gekocht. Zum Anfärben der DNA wurden 10 µl Gelstar in die nicht mehr kochende Flüssigkeit gegeben und diese in einen abgeklebten Schlitten ohne Blasenbildung pipettiert. Um während des Erkaltes des Geles die Taschen auszusparen, wurden Kämmen in den Schlitten eingesetzt.

10 µl PCR-Produkt wurden mit 2,5 µl Beschwerungspuffer vermengt, damit die DNA nach dem Pipettieren in der Tasche bleibt und nicht im TAE-Puffer verloren geht.

Tabelle 44: Zusammensetzung des Beschwerungspuffers

Inhaltsstoffe	Konzentration
Tris, pH 7,6	50 mM
EDTA	50 mM
Natriumdodecylsulfat	0,5 %
Bromphenolblau	0,1 %

Das erkaltete Gel wurde dann im Schlitten in das Gerät eingesetzt und mit TEA-Puffer aufgefüllt. Die Kämmen wurden entnommen und die DNA mit dem Beschwerungspuffer in die Taschen gegeben (12,5 µl). In die erste Tasche wurde bei jedem Lauf ein Standard (verschiedene DNA-Fragmente definierter Länge, Abstand 100 BP) gegeben. Bei 90 V und 85 – 120 mA lief das Gel ungefähr eine Stunde und konnte dann unter UV-Bestrahlung fotografiert werden. Die DNA kann durch das Gelstar sichtbar gemacht werden, da dieses einerseits durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden kann, und andererseits an die DNA bindet.

2.2.5.3.

Detection Test Strips

Die DNA Detection Test Strips basieren auf dem selben Prinzip wie der PCR-Elisa. Jeder Teststreifen kann in 5 Felder eingeteilt werden. An einem Ende befindet sich die Immersions area, die in den Chromatographie-Puffer eingetaucht wird, und am anderen das Absorbent pad, das den Puffer ansaugt. Dazwischen befindet sich in Laufrichtung das Gold conjugate pad, das Sample application pad, und die Nitrocellulosemembran mit zwei Testlinien. Die eine besteht aus fixiertem Streptavidin und stellt den eigentlichen Test dar, die andere besteht aus fixierten polyklonalen Antikörpern gegen Mausantikörper und dient als Positivkontrolle.

Zuerst wurden 25 µl Dig-PCR Produkt mit 2,5 µl spezifischer Biotin-markierter Sonde vermischt. Dieser Hybridisierungsmix wurde bei 95°C 5 min denaturiert. Anschließend erfolgte bei 37 C (30 min) die Hybridisierung der Sonde mit der DNA.

Von dem Hybridisierungsmix wurden 5 µl auf das applikations pad pipettiert. Die immersions Area wurde nun 5 sec in Chromatographie-Puffer eingetaucht wobei das goldpad nicht mit der Flüssigkeit in Berührung kommen sollte. Anschließend wurde der Streifen horizontal gelagert. Während der Inkubation löst der Laufpuffer das Gold, das an monoklonale Maus Antikörper gegen Digoxigenin gebunden ist, und transportiert es in Richtung absorbent pad. Unterwegs wird auch der Hybridisierungsmix aufgelesen und über die Anti-DIG-Antikörper mit Gold angefärbt. Wenn der Puffer die Nitrocellulosemembran durchläuft wird die spezifische Sonde über das Biotin an der Streptavidinschicht zusammen mit der bereits mit Gold angefärbten DIG-DNA fixiert. Ungebundene Anti-DIG-Antikörper laufen weiter und werden weiter oben durch die Anti-Maus-Antikörper fixiert und stellen die Positivkontrolle dar. Bereits nach 10 min konnte das Ergebnis abgelesen werden.

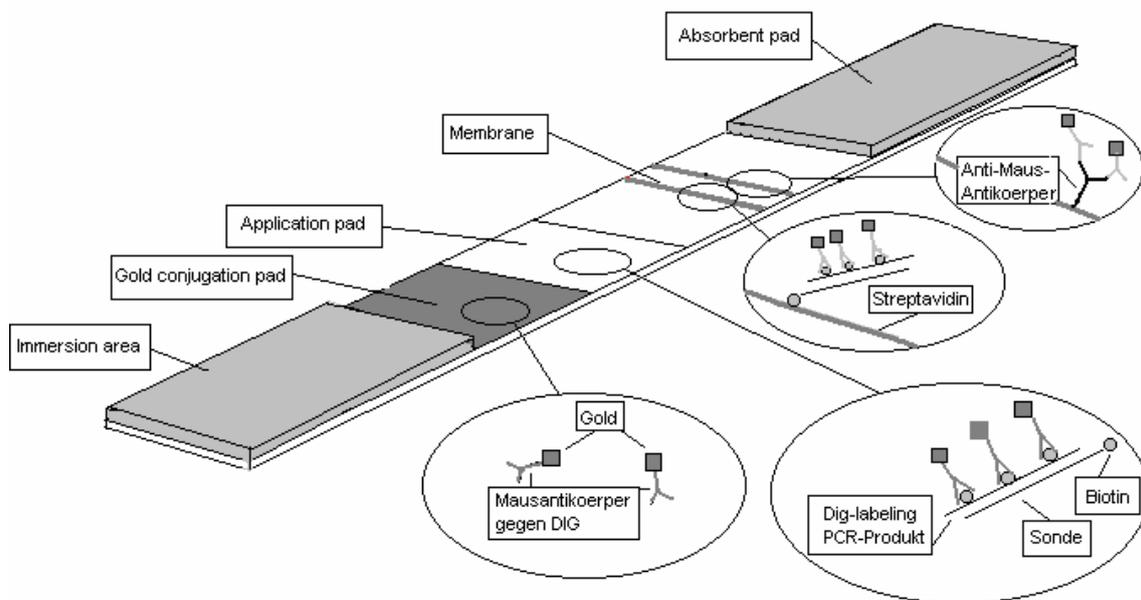


Abbildung 7: Detection Test Strips

2.2.6. Light Cycler™

2.2.6.1. Vorteile des LightCycler™

Die Light Cycler™ PCR funktioniert ähnlich wie die herkömmliche PCR. Es wurde zuerst unter sterilen Bedingungen ein Mastermix erstellt und 10µl pro Probe in LC-Kapillaren vorgelegt. Anschließend wurden unter einer anderen Sterilbank pro Probe 10µl extrahierte DNA hinzu pipettiert. Die Kapillaren können sofort verschlossen werden und müssen auch nicht mehr geöffnet werden, was das Kontaminationsrisiko senkt. Das kleinere Volumen der Proben erlaubt schnellere Temperaturänderungen und somit auch kürzere, etwa 1 min andauernde, Zyklen.

Die Kapillaren dürfen nicht am Schaft berührt werden, weil jegliche Verschmutzung zu einem falsch positiven Ergebnis geführt hätte. Zum Schutz vor Verunreinigung wurden

die Kapillaren vor dem pipettieren in gekühlte Adapter gesetzt. Nach dem Verschließen der Kapillaren wurden sie im Adapter 30 sec bei 2000 U/min zentrifugiert, um die Flüssigkeit vom Reservoir in den Schaft der Kapillaren zu befördern. Danach wurden sie vorsichtig in den Rotor des Gerätes eingesetzt.

Als Temperaturübertragungsmedium dient in diesem Gerät die Luft und kein Heizblock, wie im PCR-Thermostat, dadurch sind schnellere Temperaturänderungen (pro sec. 20 °C) möglich.

Tabelle 45: Temperaturprofil eines LightCycler-Laufes

60 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (sec)
Initiale Denaturierung	95	9 min
Denaturierung	95	1
Annealing	54	9
Extension	72	25
Term. Denaturierung	95	20
Melting curve	50	20
Melting curve	50-95	konstant

Der Mastermix setzte sich zusammen aus Wasser, Puffer, MgCl, Primer, dNTPs, Polymerase und Light-Cycler-Sonden. Die DNA Polymerase war bei Raumtemperatur wie die Gold-Taq durch hitzelabile „blocking groups“ an einigen Aminosäuren des Enzymes blockiert. Die Primer banden zwar zunächst unspezifisch an der DNA, aber es konnte keine Extension dieser ungewollten Primerbindungen stattfinden (Spezifitätserhöhung). Die Taq wurde erst durch hohe Temperatur (9 min bei 95 °C) entblockt.

Tabelle 46:LightCycler-Mastermix

PCR-Mix	Konzentration	Vol/Probe (µl)
Aqua bidest		3,65
Rreaktion mix*		2
MgCl ₂	3mM	3,2
Fl-Sonde	6µM	0,3
LC-Sonde	6µM	0,6
Fung 1+2	50µM	0,25

* In diesem Mix waren FastStart Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP und 10mM MgCl enthalten.

Die DNA Polymerase wurde erst vor der Erstellung des Mastermixes dem Reaktionsmix zugegeben.

Tabelle 47:Primer und Sonden für einen LightCycler-Lauf

Fung 1	5' ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG 3'
Fung 2	5' CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG 3'
FL Sonde	Fung UR1: 5' TTC AAC TAC GAG CTT TTT AAC TG 3'
LC Sonde (Red 640)	Fung UR2: 5' AAC AAC TTT AAT ATA CGC TAT TGG A 3'

Bei jedem Light Cycler Lauf benötigte man zwei Sonden die während der Annealingphase sehr nahe beieinander mit der Ziel-DNA hybridisieren (head-to-tail arrangement). Eine Sonde (Donor) war am 3' Ende mit Fluorescein, die andere Sonde am 5' Ende mit Red 640- oder Red 705-Fluorophor markiert. Nur wenn beide Sonden mit der DNA hybridisierten, war der Abstand klein genug, dass ein Energietransfer (Fluorescence resonance energy transfer = FRET) ermöglicht wurde. Das Fluorescein der ersten Sonde wurde durch das Licht mit der Wellenlänge von 490 nm aus dem Light Cycler angeregt und gab einen Teil dieser Energie in Form von grünem Licht an das LC

Red 640 weiter. Die emittierte Fluorescence dieses LC Red 640 wurde im LC Gerät durch Photohybride gemessen.

Nach jeder Annealingphase wurde automatisch die momentane Fluoreszenz gemessen. Während des Laufes entstanden in einer positiven Probe also immer mehr neu synthetisierte DNA-Stränge, die immer mehr Sondenpaaren die Hybridisierung ermöglichten. Also stieg auch die Fluoreszenz an. Da aber das Fluorescein auch ohne an der DNA gebunden zu sein messbares Licht abgibt, musste dieser Fluoreszenzanstieg im Verhältnis zum Fluorescein gesehen werden ($F2/F1$; $F2 = \text{Red 640}$; $F1 = \text{Fluorescein}$).

Mit Hilfe einer angeschlossenen Computersoftware besteht die Möglichkeit während des LightCycler-Laufes eine quantitative und eine qualitative Analyse der Messergebnisse und deren Dokumentation durchzuführen. In einem Diagramm mit der Zyklusanzahl als x-Achse und der Fluoreszenz als y-Achse ist der echte Fluoreszenzanstieg darstellbar. Als nächstes wurde die sogenannte „Noise Band“ an den Beginn des linearen Anstieges der Kurven gesetzt, so dass nur die positiven Proben darüber lagen. Die Schnittstellen der Kurven mit dieser „Noise Band“ wurden ermittelt.

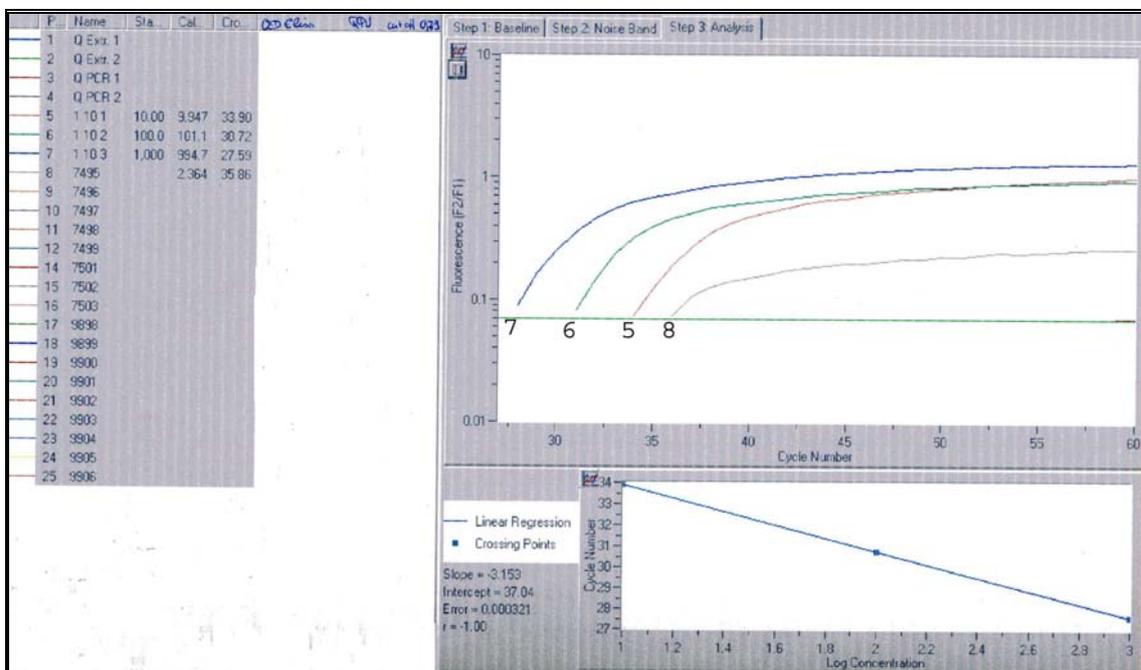


Abbildung 8: LightCycler

Die sogenannten „Crossing Points“ der Verdünnungsreihe (Proben mit bekannter Konzentration) wurden in einem weiteren Diagramm (x-Achse: Konzentration; y-Achse: Zyklusnummer) miteinander zu einer Regressionsgerade verbunden, anhand derer die Konzentration der positiven Patientenproben abgelesen werden konnte. Folglich könnte man mit dieser Methode enorm an Zeit gewinnen, da eine Quantifizierungsmethode, wie der PCR-Elisa, nicht mehr nötig wäre.

2.2.6.2. Sondenkombinationen

Wie beim Elisa kann man auch beim Light Cycler verschiedene Sonden verwenden.

Tabelle 48: LightCycler-Sonden

Aspergillus fumigatus FL	5' GTT CCC CCC ACA GCC AGT GAA GGC 3'
Aspergillus fumigatus LC	Red 640 5' TGA GGT TCC CCA GAA GGA AAG GTC CAG C 3'
Candida albicans FL	5' AGC CTT TCC TTC TGG GTA GCC ATT 3'
Candida albicans LC	Red 705 5' TGG CGA ACC AGG ACT TTT ACT TTG A 3'
Candida glabrata FL	5' GCC TTT CCT TCT GGC TAA CCC CAA 3'
Candida glabrata LC	Red 640 5' CCT TGT GGC TTG GCGGCG AA 3'
Fung UR1 FL	5' TTC AAC TAC GAG CTT TTT AAC TG 3'
Fung UR2 LC	Red 640 5' AAC AAC TTT AAT ATA CGC TAT TGG A 3'

Die Aspergillus fumigatus Sonde ist in der Lage Aspergillus fumigatus und Aspergillus flavus zu detektieren (94). Ähnlich wie bei der Multiplex-PCR besteht auch hier die Möglichkeit in einem LC-Lauf zwei Sondenpaare zu verwenden, wenn eine LC-Sonde an Red 640 und die andere an Red-705 gebunden ist. Bei der Auswertung F2/F1 (Red 640/Fluorescein) und F3/F1 (Red 705/Fluorescein) sind jeweils alle Kurven zu sehen. Somit kann man nicht ausmachen, welche Kurve durch welche Sonde entstanden ist.

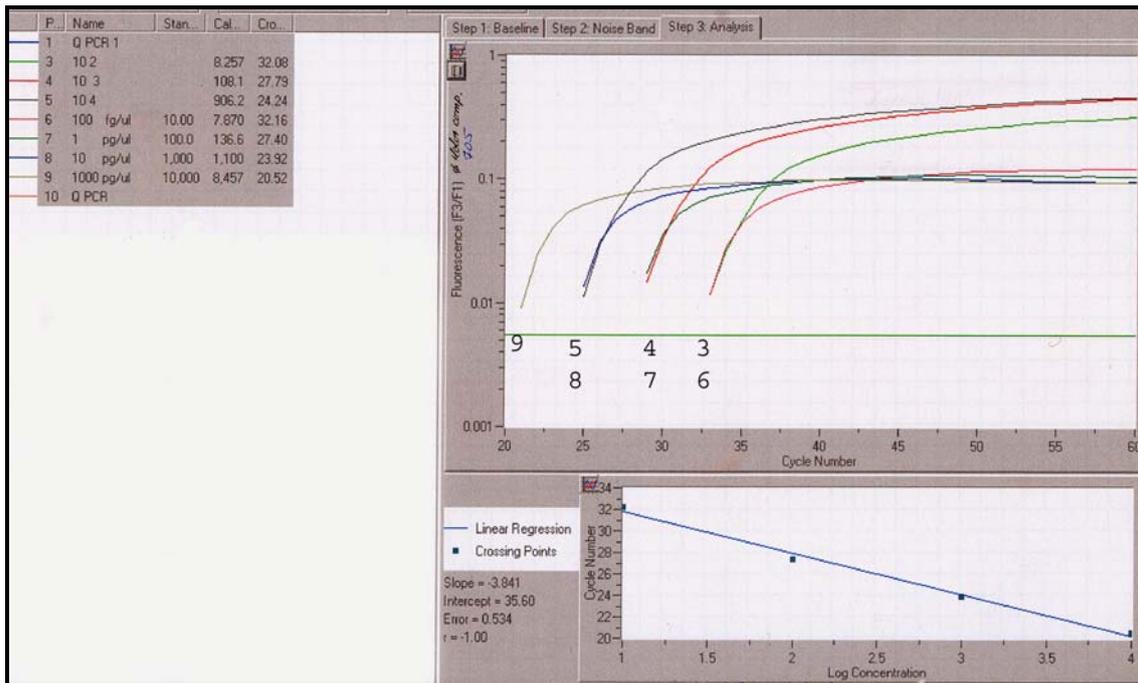


Abbildung 9: Ohne Color compensation

Um dieses Problem zu umgehen wurden die sogenannte „Color compensation“ entwickelt, welche die Fluoreszenz des jeweils anderen Kanales unterdrückte. Jetzt kann man genau festmachen, welche Probe welchen-, oder ob eine Probe vielleicht beide Pilze enthält.

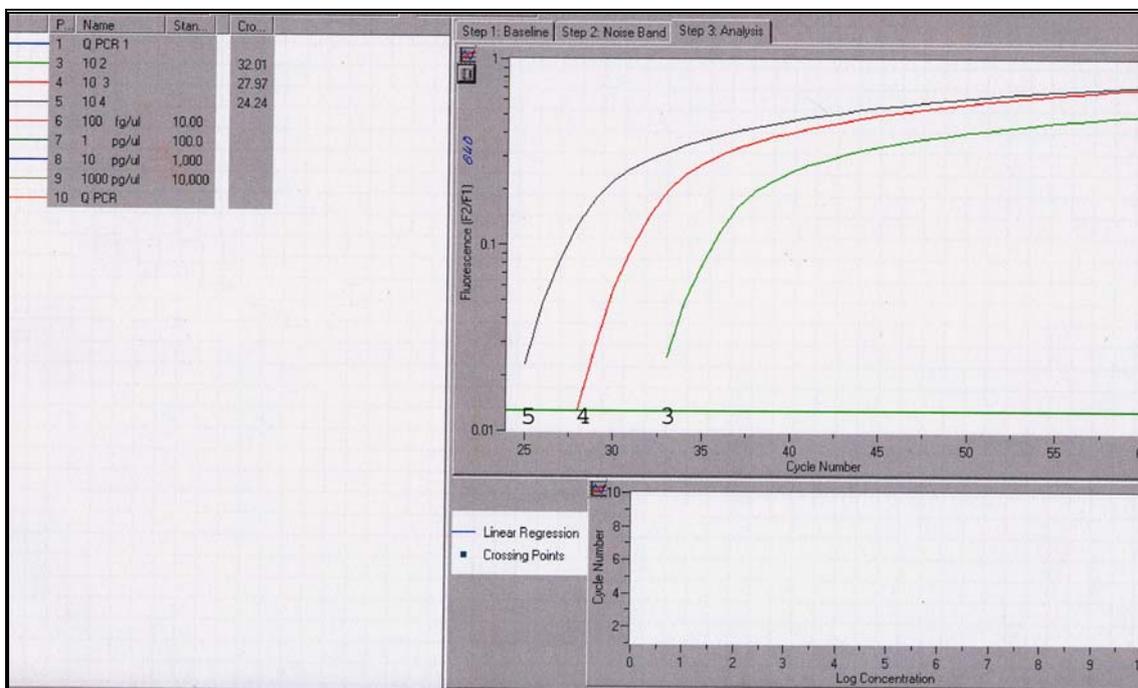


Abbildung 10: Aspergillusproben

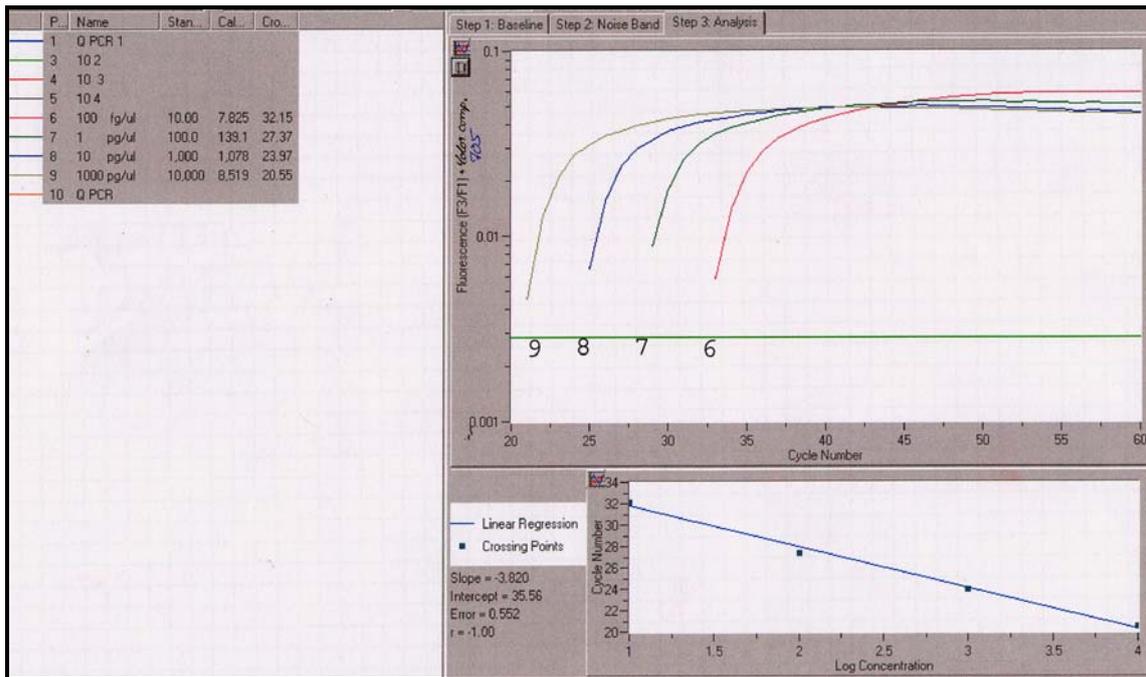


Abbildung 11: Candidaprobe

2.2.7. Sequenzierung

Die common Pilz Sonde wurde verwendet um Erfahrungen zu sammeln, inwieweit auch andere Pilze außer *Aspergillus fumigatus* und *Candida* spp. zu einer Pilzinfektion bei KMT-Patienten führen. Dazu sollten die Proben nach der PCR erst aufgereinigt werden, um noch vorhandene Nukleotid- und Primerrückstände beseitigen zu können. 40µl des PCR-Produktes wurden in 1.500 µl-Tubes überführt und mit 200µl PB-Puffer aus dem Qiaquick-Purification-Kit gut vermischt. Der PB-Puffer bewirkt eine DNA-Fällung. Der Gesamtinhalt wurde auf ein Qiagen-Säulchen mit Auffanggefäß übertragen und bei 13.000 U/min eine Minute lang zentrifugiert. Jetzt haftete die DNA an der Silicamembran des Säulchens. Das Auffanggefäß wurde ausgelehrt und die Proben nach der Zugabe von 750µl PE-Puffer und einer kurzen Inkubation von einer Minute erneut wie oben zentrifugiert. Dieser Waschschrift kann unter Umständen wiederholt werden. Um die letzten Reste des PE-Puffers zu beseitigen, wurden die Proben nach dem Leeren

der Auffanggefäße erneut 1 min bei 14.000 zentrifugiert. Anschließend wurde das Säulchen auf ein 1.500µl-Tube übertragen und nach der Zugabe von 30µl EB-Puffer und einer einminütigen Inkubation abermals eine Minute lang bei 13.000 U/min zentrifugiert, und so die an der Membran haftende DNA eluiert. Nach der Aufreinigung wurde die Sequenzierungs-PCR mit dem ABI PRISM BigDye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit durchgeführt.

Tabelle 49: BigDye-Zusammensetzung

Inhaltsstoffe:
AmpliTaq DNA-Polymerase FS
Thermostabile Pyrophosphatase
dNTP's
dITP
BigDye markierte ddNTP's
Puffer

Dazu wurden von jeder Probe des aufgereinigten PCR-Produktes zweimal 3µl in verschiedene PCR-Tubes überführt und je eine Probe mit 17 µl Mastermix 1 und die andere mit Mastermix 2 vermennt.

Tabelle 50: Mastermix 1:

Inhaltsstoffe	Konzentration
Vorwärtsprimer	5 pmol
BigDye*	4µl

Tabelle 51: Mastermix 2:

Inhaltsstoffe	Konzentration
Rückwärtsprimer	5 pmol
BigDye*	4µl

BigDye besteht aus fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, 10xPuffer und Taq-Polymerase

Die Proben wurden anschließend erneut im PCR-Gerät amplifiziert.

Tabelle 52: Temperaturprofil einer Sequenzierungs-PCR:

25 Zyklen	Temperatur (C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	96	4
Denaturierung	96	10 sec
Annealing	56	5 sec
Extension	60	4

Auch nach dieser PCR war noch eine Aufreinigung nötig, um noch vorhandene fluoreszenzmarkierte Nukleotide zu beseitigen. Dazu wurden 800µl Ampuwa in Centrisep-Säulchen übertragen und so während einer Inkubationszeit von 30 Minuten zum Aufquellen des Ionenaustauscherharzes in den Säulchen führte. Nach der Inkubation wurde das überschüssige Wasser 2 Minuten lang bei 3.000U/min in ein Auffanggefäß abzentrifugiert. Die Säulchen wurden anschließend auf Tubes - und die Proben in die Säulchen übertragen. Wieder folgte eine Inkubation von einer Minute und ein Zentrifugationsschritt von zwei Minuten bei 3.000 U/min, durch den das Eluat gelöst und in den Tubes aufgefangen wurde. Das aufgereinigte Eluat wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge für etwa 40 Minuten unter flüssigem Stickstoff eingedampft. Die Sequenzierung erfolgte dann im Labor von Dr.J.Kuhn im Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Macintosh Quadra und den Programmen Data-collection 1.2.1. und Analysis 2.1.

2.2.8. Statistische Analyse

Beim Vergleich der beiden diagnostischen Testverfahren wurde auch die Zahl der durchgeführten Proben als Untersuchungseinheit gewählt. Dabei ist zu beachten, dass sich darunter auch mehrere Proben befinden, die von den gleichen Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen wurden. Diese Proben wurden bei der statistischen Analyse genauso als unabhängig voneinander betrachtet, wie die Proben,

die von verschiedenen Patienten abgenommen wurden. Ein statistischer Nachweis dieser Unabhängigkeitsaussage ist nicht möglich. Aus klinischer Sicht kann man aber davon ausgehen, dass die Ergebnisse einer Patientenprobe bei beiden diagnostischen Tests unabhängig vom Ergebnis eines gleichartigen Tests beim gleichen Patienten zu einem früheren Zeitpunkt ist. Aus diesem Grund wurde in der statistischen Auswertung die Unabhängigkeitsannahme beibehalten. Zusätzlich erfolgte auch eine Analyse auf Patientenebene.

3. Ergebnisse

3.1. Extraktion

3.1.1. RCLB-Ansätze

Je 500µl Aspergillus-Konidien einer Verdünnungsreihe (10^0 - 10^4 CFU) wurden mit je 5 ml Blut gesunder Personen vermischt. Auf diese Weise wurden drei Verdünnungsreihen hergestellt. Eine Verdünnungsreihe wurde mit RCLB, WCLB und Lytikase extrahiert (s. 2.2.2.1.), eine weitere mit einer 1% igen RCLB-Triton-X-100-Mischung (s. 2.2.2.2.), und die dritte mit einer 1 % igen RCLB-Saponin Lösung (aus Quillaja-Algen) (s. 2.2.2.3.). Die Extraktionsprodukte wurden mit dem Qiagen-Kit aufgereinigt, amplifiziert (s. 2.2.3.1.) und im Dig-labeling-Elisa (s. 2.2.5.1.) nachgewiesen.

Da alle Proben aus der Saponin-Reihe negativ waren, muss man davon ausgehen, daß irgendein Mechanismus der Extraktion, der Aufreinigung, der PCR oder des Elisas durch das Saponin inhibiert wurde.

Der Triton-X-100-RCLB führte im Vergleich zum Routine-RCLB zu keiner Sensitivitätssteigerung. Bei beiden Verfahren war die 10^0 -Probe negativ und die 10^1 -Probe positiv ausgefallen.

3.1.2. Zentrifugieren bei 13.000 U/min

Zunächst wurden zwei Verdünnungsreihen hergestellt. (s. 2.2.1.). Eine Verdünnungsreihe wurde gleich in Eppendorf-Cups übertragen (s. 2.2.2.4.), die andere erst nach der WCLB-Inkubation (s. 2.2.2.5.).

Die erste Verdünnungsreihe war nach dem zweiten. RCLB-Durchgang noch viel zu rot. Das deutet darauf hin, dass das 1:1 Blut-RCLB-Verhältnis zur Erythrozytenlyse nicht ausreicht.

Die aufgereinigten Proben wurden wie unter 2.2.3.1. weiter behandelt.

Beide Verfahren haben im Vergleich zur Routine zu einem Sensitivitätsverlust geführt, da die 10^1 -Probe der Routine positiv ausfiel aber die Reihe, die ab dem WCLB in kleine Cup's übertragen wurde erst bei 10^2 CFU ein positives Ergebnis lieferte und die Reihe mit dem 1:1-RCLB gar erst ab 10^3 CFU.

3.1.3. Probenvolumen

Jeweils 500µl einer Aspergillus-Konidien-Verdünnungsreihe (10^0 - 10^3 CFU) wurden in 4 Blutproben eines gesunden Probanden aufgenommen. Die Blutproben wurden in zwei Volumina (4,5 ml und 500 µl) aufgeteilt. Beide Verdünnungsreihen wurden wie unter 2.2.2.1. extrahiert.

Die Probenvolumenreduktion auf 500 µl geht mit einem erheblichen Sensitivitätsverlust einher. Die 4,5 ml-Reihe lieferte mit dem PCR-Elisa-Verfahren ab 10^0 CFU und mit dem LightCycler-Verfahren ab 10^1 CFU ein positives Ergebnis, wobei sowohl im PCR-Elisa und im LightCycler –Verfahren erst die 10^3 -Proben der 500µl-Reihe positiv ausfielen.

3.2. Aufreinigung des Extraktionsproduktes

Die Kits der Firmen Qiagen und Roche erzielten ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Sensitivität. Beide Reihen lieferten bereits ab 10^0 CFU positive Ergebnisa. Im Light Cycler wird aber doch ein Sensitivitätsverlust zu Lasten des Roche-Kits erkennbar.

Die Aufreinigung unter der Verwendung der drei Kits von peq-lab gehen alle mit beachtlichen Sensitivitätsverlusten einher, was auf die Überführung in neue Cups zurückzuführen sein könnte (positive Probenergebnisse bei peqGOLD GelPure™ Kit ab

10² CFU und bei E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit und peqGOLD DNAPure™PT jeweils ab 10⁴ -Proben).

3.3. PCR

3.3.1. Primer

3.3.1.1. Asp sp. + Fung 2

Die Gelelektrophorese der Aspergillus-fumigatus-Verdünnungsreihe und der Candida glabrata- und –tropicalis-Proben nach der PCR unter der Verwendung der Asp sp. und Fung 2 Primer-Kombination ergaben positive Ergebnisse in der Aspergillus fumigatus-Verdünnungsreihe ab der 10⁰ CFU –Verdünnung, die Candida glabrata und –tropicalis-Proben bleiben aber jeweils negativ.

Das Ergebnis macht deutlich, dass mit dieser Primerkombination vorwiegend Aspergillus fumigatus nachgewiesen werden kann.

3.3.1.2. C.alb sp. + Fung 2

Nach der PCR unter Verwendung der A.alb sp. und Fung 2-Primerkombination waren im Gel wie erwartet alle Candida albicans- und die Candida tropicalis-Proben positiv, die Aspergillusproben, genauso wie die Candida glabrata-Probe waren negativ

3.3.1.3. Aspspez 1 + 2

Unter Verwendung des spezifischen Aspergillus-Primer-Paares Aspspez 1 und 2 konnte im Vergleich zur Routinediagnostik mit Fung 1 und 2 ein Sensitivitätsverlust verdeutlicht werden, da nur die 10^6 CFU und die 10^5 CFU Aspergillusproben im Gel positiv waren.

3.3.2. Multiplex-PCR

Mit dieser Multiplex-PCR unter Verwendung sowohl eines spezifischen Aspergillus- als auch eines spezifischen Candida-albicans-Primers in Kombination mit einem unspezifischen Rückwärtsprimer konnten sowohl Aspergillus- als auch Candida-Pilze der Verdünnungsreihen bis 10^1 CFU im Gel erkannt werden. Unspezifische Banden waren reduziert.

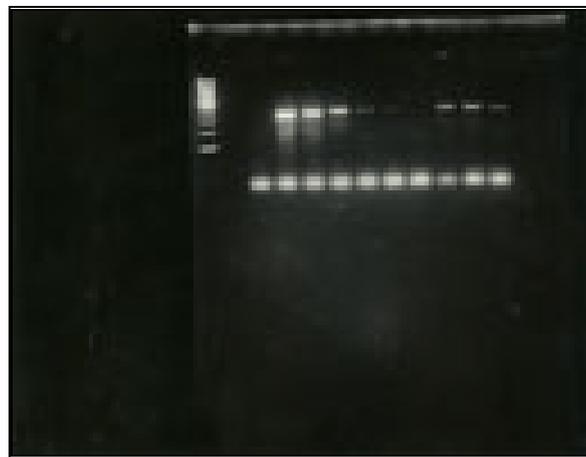


Abbildung 12: Verdünnungsreihe Asp sp. + C.alb sp + Fung 2

Tabelle 53: zu Abbildung 12

neg.	A. fum. 10^6 CFU	A. fum. 10^5 CFU	A. fum. 10^4 CFU	A. fum. 10^3 CFU	A. fum. 10^2 CFU	A. fum. 10^1 CFU	C. alb. 10^3 CFU	C. alb. 10^2 CFU	C. alb. 10^1 CFU
-	+++	++	++	+	+	-	+	+	+

3.3.3.

Nested PCR

3.3.3.1. Nested PCR mit Taq-Polymerase

Die bessere Funktion der Polymerase im 2. PCR-Ansatz der nested PCR wird eindrucksvoll in diesem Gel verdeutlicht.

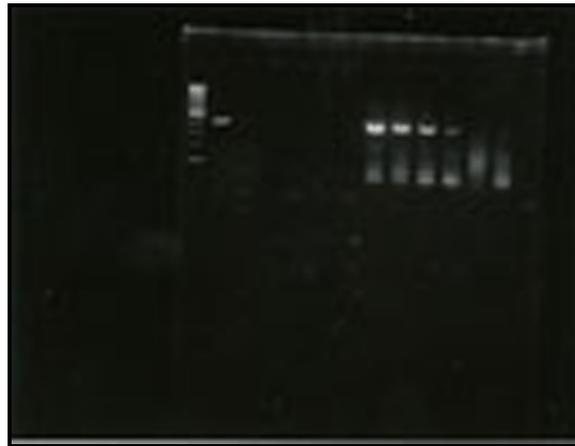


Abbildung 13: Nested-PCR mit Taq-Polymerase

Tabelle 54: zu Abbildung 13

	A. fum. 10 ⁴ CFU	A. fum. 10 ³ CFU	A. fum. 10 ² CFU	A. fum. 10 ¹ CFU	A. fum. 10 ⁰ CFU	Neg 1. PCR	Neg 2. PCR
1. PCR	+	(+)	-	-	-	-	
2. PCR	++	+	+	+	-	-	-

Zwischen der 1. und der 2. PCR ist eine deutliche Sensitivitätsverbesserung erkennenbar.

3.3.3.2. Nested-PCR mit Pfu-Polymerase

Bei der mit Pfu-Polymerase angesetzten nested-PCR waren in allen Läufen die Negativkontrollen leider leicht positiv.

3.3.3.3. Gold Taq-Polymerase

In der mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführten nested PCR waren im Gel Aspergillus-positive Patientenproben positiv, leider auch Aspergillus-negative Patientenproben. Dies und der immense Sensitivitätssprung von 10^5 CFU bis 10^0 CFU zwischen der 1. PCR mit Fung- Primern und der 2. PCR mit NES-Primern deuten darauf hin, dass eine Kreuzreaktion der NES Primer mit Human-DNA angenommen werden muss.

3.4. Quantifizierung

3.4.1. DIG-labeling PCR-Elisa

Als Messergebnis beim PCR-Elisa erhält man für jede Probe einen Extinktionswert. Der dreifache Extinktionsdurchschnitt der Negativproben (Extraktion, PCR und Elisa) wird als „cut off“ verwendet, das bedeutet, dass die Proben, deren Extinktionswert über dem cut off liegen, als positiv zu werten sind. Für diese Proben kann man noch den „relativ positiv value“ (RPV) als Quotient zwischen Extinktionswert und cut off berechnen.

3.4.2. Detection Test Strips

Wie beim Elisa können verschiedene Sonden verwendet werden. Mit der Aspergillussonde werden Konzentrationen bis 10^0 CFU erkannt während Candida-Negativ- und Humanproben negativ bleiben. Die Candida Sonde kann als Common-fungal-Sonde eingesetzt werden. Auch hier bleiben Negativ- und Humanproben negativ.

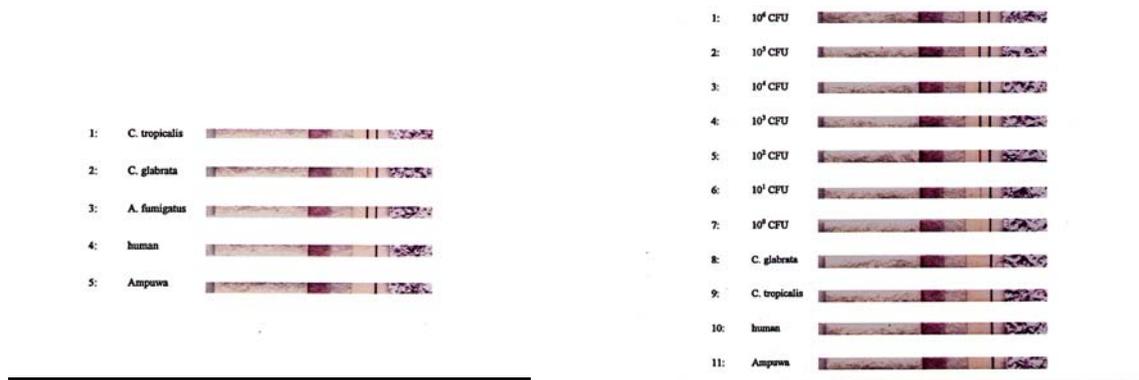


Abbildung 14: Detection-Strips

3.5. Light Cycler™

3.5.1. Umfang der Light Cycler Studie

Bei diesem Teil der Arbeit wurden die Ergebnisse von 846 Blutproben aus dem PCR-Elisa- und aus dem Light Cycler-Lauf verglichen. Die Proben wurden in der Regel zweimal wöchentlich von insgesamt 171 stammzelltransplantierten Patienten (KMT PBSCT) oder aus der Medizinischen Klinik und der Poliklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Abteilung Innere Medizin II, (bis 100 Tage nach der Transplantation) im Rahmen einer prospektiven Studie gewonnen und parallel im PCR-Elisa und im LightCycler auf Candida- und Aspergillus-DNA untersucht. Die Patienten wurden mit 3 mg/kg KG AmBisome therapiert, wenn drei aufeinanderfolgende Proben

aus der PCR-Elisa-Analyse positiv waren, oder bei Fieber, das unter antibiotischer Behandlung nicht innerhalb von 120 h abklingt. Für die Therapieentscheidung blieben die Ergebnisse des Light Cycler-Verfahrens unberücksichtigt. Zusätzlich wurden 192 Proben mit einer Light-Cycler-Sonde analysiert, die die DNA vieler Pilzarten detektieren kann.

3.5.2. Konditionierungstherapie

Um die Abstoßung der transplantierten Zellen zu verhindern wurden die Patienten im Rahmen einer Konditionierungstherapie auf die Stammzellentransplantation vorbereitet. Die Patienten erhielten entweder eine myeloablative Chemotherapie mit Busulfan (4*1 mg/kg KG an den Tagen -7 bis -4) und Cyclophosphamid (2 * 60 mg/kg KG an den Tagen -6 bis -4) oder eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (GD 12 Gy, ED 2 Gy, 2 * 2 Gy an den Tagen -6 bis -4) kombiniert mit Cyclophosphamid (2* 60 mg/kg KG an den Tagen -3 bis -2).

Alle Patienten wurden zum Zeitpunkt der Konditionierung prophylaktisch antimykotisch behandelt.

3.5.3. Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 171 Patienten prospektiv mit beiden Nachweismethoden auf Aspergillus- und Candida-DNA im Blut untersucht. Daraus resultierte ein Probenvolumen von 846 Proben (Mittelwert 4,95, Spannweite 1-25 Proben pro Patient). Von diesen 171 Patienten wurden nun die Patienten herausgesucht, von denen mindestens drei Proben analysiert wurden, und davon mindestens ein Probenergebnis positiv ausgefallen war. Dabei ergab sich eine Probenanzahl von 532 Proben

(Mittelwert 10,59, Spannweite 3-25 Proben pro Patient). Die Akten und der klinische Verlauf dieser 51 Patienten wurden ausgewertet.

Eine Zusammenfassung der Patientenmerkmale zeigt Tabelle 63.

Tabelle 55: Patienten

		Anzahl der Patienten
Geschlecht	männlich	32
	weiblich	23
Alter in Jahren	Durchschnitt	28,43
	Spannweite	1-61
Grunderkrankung	ALL	12
	AML	11
	CML	11
	Plasmozytom	7
	MDS	7
	NHL	2
	Apl. Anämie	2
	Osteomyelofibrose	1
	HL	1
Stammzellen	KMT	22
	PBSCT	29
Beobachtungszeitraum Pro Patient (in Tagen)	Durchschnitt	74,51
	Spannweite	15-187

3.5.4. Vergleich der Testergebnisse

Die 846 Proben wurden parallel mit der PCR- und der LightCycler-Methode untersucht und können nun in einer Vierfelder-Tafel analysiert werden.

Tabelle 56: Vier-Felder-Tafel der gesamten Proben

	PCR-Elisa pos.	PCR-Elisa neg.	Gesamt
Light cyclers pos.	30 Proben 3,55%	16 Proben 1,89%	46 Proben 5,44%
Light cyclers neg. -	90 Proben 10,64%	710 Proben 83,92%	800 Proben 94,56%
Gesamt	120 Proben 14,18%	726 Proben 85,81%	846 Proben 100%

Von den 120 PCR-Elisa positiven Proben waren 30 (25%) ebenfalls in der LightCycler-Methode positiv ausgefallen. Mit dem LightCycler-Verfahren konnten 46 Proben positiv getestet werden, von denen 30 (65,22%) Testergebnisse ebenfalls im PCR-Elisa-Verfahren positiv ausfielen. 740 Resultate stimmten überein, während 106 Testergebnisse im Vergleich unterschiedlich ausfielen.

3.5.5.

Ergebniskorrelation

3.5.5.1.

Proben

In Tabelle 57 sind die Ergebnisse der Elisa-positiven Proben in Form von RPV und LC-Zyklen-Anzahl miteinander vergleichbar. Die Proben wurden entsprechend ihrer RPV-Werte in 5 verschieden große Gruppen aufgeteilt. Innerhalb dieser Gruppen wurde dann die Probenanzahl der Elisa-positiven Proben, der Proben die in beiden Verfahren positive Ergebnisse ergaben und die Mittelwerte, die Medianwerte und die Spannweiten anhand der LC-Zyklen-Anzahlen ermittelt.

Tabelle 57: Ergebniskorrelation

RPV	1,0-2,4	2,5-4,9	5,0-9,9	10,0-19,9	20 und mehr
Probenanzahl (Elisa-pos)	55	29	19	9	8
davon Probenanzahl (LC-pos)	5	4	7	6	8
Mittelwert (LC-Zyklen)	3,25	3,47	13,94	23,01	34,87
Spannweite (LC-Zyklen)	27,72 -	24,67 -	32,62 -	24,24 -	21,87 -
	41,93	39,47	41,5	41,89	42,58

Aus der Tabelle geht hervor, dass mit dem LightCycler-Verfahren die Proben mit einer niedrigen Pilzlast nicht zuverlässig ermittelt werden können.

3.5.5.2.

Patienten

In einer weiteren Vierfeldertafel können nun die beiden Methoden während des Untersuchungszeitraumes der Patienten miteinander verglichen werden.

Tabelle 58: Vier-Felder-Tafel der Patienten

	PCR-Elisa pos.	PCR-Elisa neg.	Gesamt
Light cycler pos.	32 (18,28%)	4 (2,28%)	36 (20,57%)
Light cycler neg. -	55 (31,43%)	84 (48%)	139 (79,43%)
Gesamt	87 (49,71%)	88 (50,28%)	175 (100%)

Von 175 Patienten zeigten 36 eine mit dem LightCycler-Verfahren nachgewiesene Pilzinfektion während die Proben von 139 Patienten im gesamten Untersuchungszeitraum im LightCycler-Verfahren negativ blieben.

Die PCR-Elisa-Methode konnte dagegen bei 87 Patienten eine Pilzinfektion detektieren wobei bei 88 Patienten mit dieser Methode keine Infektion nachgewiesen werden konnte.

3.5.6. Zeitpunkt der erstmaligen Reaktivierung im Vergleich

Von 51 Patienten konnten bei 11 Patienten sowohl mit der LC- als auch mit der PCR-Elisa-Methode im gesamten Verlauf Proben als positiv detektiert werden. Bei diesen Patienten wurde in beiden Nachweisverfahren der Zeitpunkt der ersten positiven Blutprobe bestimmt. In diese Studie wurden nur Patienten einbezogen, bei denen neben der Pilzlast der 1. positiven Blutprobe auch das letzte noch negative Ergebnis bestimmt worden war. Die Zeitspanne zwischen diesen beiden Proben durfte nicht mehr als 14 Tage betragen. Insgesamt wurden 5 Episoden mit positiven Ergebnissen beobachtet (Tabelle 59). 6 Patienten wurden von der Untersuchung ausgeschlossen da bei 3 Patienten ein vorangegangenes negatives Ergebnis fehlte, und bei 3 Patienten ein zu großes Zeitintervall zwischen beiden Proben bestand. In 3 Fällen waren beide Verfahren zur gleichen Zeit fündig geworden, in einem Fall war die LC-Methode eine Woche später als die PCR-Methode positiv und bei einem Patienten waren die LC-Proben trotz bereits radiologisch nachgewiesenen pulmonalen Infiltraten erst nach 4 Wochen positiv.

Tabelle 59: Zeitpunkt der Infektion

Patient	PCR Wochen nach KMT	LC Wochen nach KMT	Klinik	
1	11	11	nein	
2	12	12	nein	
3	7	7	nein	
4	5	6	nein	
5	8	12	8	Pul. Infiltrate
Mittelwert	8,6	9,6	8	
Spannweite	5-12	6-12	8	

3.5.7.

Therapiesteuerung

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Eignung des LightCyclers zur Steuerung antimykotischer Therapien untersucht. Dabei wurden nur die Patienten eingeschlossen, die nach initial positiven Resultaten während einer Therapie auch eine Abnahme der Pilzlast zeigten. Die Zeitspanne zwischen dem letzten positiven und dem ersten negativen Ergebnis durfte außerdem nicht mehr als 14 Tage betragen.

Von 51 beobachteten Patienten wurden 30 antimykotisch behandelt und davon wiesen 5 ein LC-positives Ergebnis in ihrem Beobachtungszeitraum auf. (Tabelle 60). Dabei mussten 2 Patienten von der Untersuchung ausgeschlossen werden, da sie eine zu große Zeitspanne zwischen positiver und erster negativer Probe aufwiesen.

Bei Patient 1 wurde schon vor KMT eine Pilzlast im Blut nachgewiesen und entsprechend behandelt. Beide Verfahren kamen bereits eine Woche nach KMT zu einem negativen Ergebnis. Im zweiten Fall wies vor Therapiebeginn nur die LC-Methode eine positive Blutprobe auf und ebenfalls nach einer Woche konnte mit diesem Verfahren keine Pilzbelastung mehr nachgewiesen werden. Beim 3. Patienten blieb das Ergebnis mit der PCR-Methode noch eine Woche länger positiv als mit der LC-Methode.

Tabelle 60: Therapie

Patient	Therapiebeginn (Wochen nach KMT)	1. neg. PCR (Wochen nach KMT)	Differenz	1. neg. LC (Wochen nach KMT)	Differenz
1	0	1	1	1	1
2	6	-	-	7	1
3	12	14	2	13	1
Mittelwert	6	7,5	1,5	7	1
Spannweite	0-12	1-14	1-2	1-13	1

3.5.8.

Klinischer Vergleich

Bei 51 Patienten wurden zur Beurteilung des klinischen Verlaufes die Krankenakten ausgewertet. Von diesen 51 Patienten erkrankten 7 an einer vermuteten invasiven Pilzinfektion (radiologisch oder sonographisch nachgewiesene pulmonale oder hepatische Infiltrate ohne Blutkultur oder Biopsie). In 6 Fällen handelte es sich um pulmonale Infiltrate und in einem Fall um eine hepatische Läsion. Außerdem erlitten 3 von 51 Patienten eine gesicherte invasive Pilzinfektion (Pilznachweis in sterilen Proben wie einer Blutkultur oder einer BAL). In einem Fall wurde eine invasive Candidose per Blutkultur, in einem anderen eine invasive pulmonale Aspergillose per BAL und bei einem weiteren Patienten wurde ebenfalls eine invasive pulmonale Aspergillose durch eine BAL und eine Blutkultur nachgewiesen.

Tabelle 61: Klinik

Patient	Invasive Pilzinfektion	Pilz	Befund	LC	PCR-Elisa
1	gesichert	Candida albicans	Blutkultur	-	negativ
2	gesichert	Aspergillus fumigatus	BAL & pulmonale Infiltrate	Asp. 36,1	negativ
3	gesichert	Aspergillus fumigatus	Blutkultur, BAL & pulmonale Infiltrate	negativ	negativ
4	vermutet	Hefepilze	pulmonale Infiltrate	negativ	negativ
5	vermutet	Hefepilze	hepatische Infiltrate	negativ	Can 1,3
6	vermutet	Candida krusei	pulmonale Infiltrate	-	negativ
7	vermutet	Candida albicans	pulmonale Infiltrate	negativ	Can. 1,5
8	vermutet	Aspergillus fumigatus	pulmonale Infiltrate	negativ	Asp. 1,1
9	vermutet	Aspergillus fumigatus	pulmonale Infiltrate	-	Asp. 2,2
10	vermutet	Aspergillus fumigatus	pulmonale Infiltrate	negativ	Asp. 4,5

3.6.

Sequenzierung

6 Proben, die im Elisa negativ waren, haben mit der Comen-Pilz-Sonde ein positives Ergebnis geliefert. Eine Probe konnte sequenziert werden. Das Ergebnis war leider nicht eindeutig (*Aspergillus terreus* oder *Paecilomyces varicotii*).

4.

Diskussion

Die weltweite Zunahme der invasiven Mykosen in den letzten 20 Jahren (2, 11, 79, 87, 118) ist die Kehrseite des Fortschrittes in der Medizin, denn diese Infektionen finden sich gehäuft bei Patienten unter Chemotherapie oder nach einer Transplantation, insbesondere Patienten nach einer Knochenmarkstransplantation sind gefährdet, aber auch andere immunsupprimierende Ursachen wie maligne hämatologische Erkrankungen, AIDS, die notwendige Behandlung auf der Intensivstation oder die Therapie mit Kortikosteroiden (11, 57, 98, 112) begünstigen eine Pilzinfektion (79, 85). Nosokomiale Erreger, die für immunkompetente Patienten als apathogen gelten, können bei immunsupprimierten, neutropenen Patienten, die einer hohen Infektgefährdung ausgesetzt sind (150) invasive Mykosen auslösen. Konnte früher das Erregerspektrum der invasiven Mykosen auf *Aspergillus* – und *Candida* spp. beschränkt werden, so hat man feststellen müssen, dass immer mehr als apathogen geltende Pilze, wie z.B. *Malassezia furfur*, ein Pilz der zur Normalflora der Haut gezählt wird und der über zentralvenöse Katheter ins Blut gelangen kann, nach Transplantationen invasive Mykosen hervorrufen können (147). Diese stellen für dieses Patientengut eine lebensbedrohliche Erkrankung dar (124, 125, 134, 136, 138) und werden zu 80% von *Candida*- oder *Aspergillus* spp. verursacht (158). Aus diesem Grund sollten Pilzinfektionen bei diesen Patienten möglichst frühzeitig schon bei klinischem Verdacht (112, 118) adäquat behandelt werden, um diesen Nebenwirkungen der modernen Medizin entgegen zu wirken. Von einer frühzeitig eingeleiteten antimykotischen Therapie profitieren die Patienten erheblich, denn die Morbidität und die Mortalität dieser Patienten können auf diese Weise gesenkt werden (11, 126). Die häufigste tödlich verlaufende Infektion bei Patienten mit Leukämie oder nach einer Knochenmarkstransplantation ist die invasive Aspergillose (33). Um diese Komplikationen zu vermeiden hat man begonnen die Patienten prophylaktisch mit Antimykotika wie Fluconazol oder Ketoconazol bzw. Amphotericin B zu behandeln (79, 118, 125, 126, 158). Dadurch wurde aber nicht nur die Reduktion der Inzidenz der *Aspergillus*- und *Candida albicans* Infektionen (11, 96, 133) und der Morbidität neutropener Patienten (13) erreicht, leider wurde das Erregerspektrum von *Candida albicans* auf andere *Candida* spp. verschoben (76, 79, 81, 133, 153). Außerdem haben

einige Spezies durch den vermehrten Kontakt mit Antimykotika Resistenzstrategien entwickeln können. Ein weiterer Punkt, der Unstimmigkeiten in Bezug auf die antimykotische Prophylaxe hervorruft, ist die erhebliche Toxizität des derzeitigen Goldstandards Amphotericin B (11, 17, 132, 145). Um aber weitere Resistenzentwicklungen vorzubeugen, kann man die Möglichkeit der engmaschigen Screening-Blutuntersuchung und im Bedarfsfalle einer umgehenden erregerspezifischen antimykotischen Behandlung nutzen (78). Die PCR- und die LightCycler-Methoden sind dafür besonders geeignet, da sie beide verhältnismäßig zügig speziesspezifische Ergebnisse liefern. Mit der LightCycler-Methode können die Ergebnisse binnen eines Arbeitstages vorliegen und die Patienten entsprechend schnell und speziessgenau behandelt werden.

4.1. Extraktion von Pilz-DNA

In der Pilzdiagnostik ist die Extraktion der zeitaufwendigste Arbeitsschritt. Viele Arbeitsgruppen haben versucht dieses Verfahren zu optimieren. Leider sind nicht wenige Methoden für die Routinediagnostik ungeeignet, sei es weil sie zu kostspielig sind, weil zu wenig DNA freigesetzt wird, weil toxische Chemikalien verwendet werden müssen (52, 128), oder weil sie zu zeit- oder arbeitsaufwendig sind (47).

4.1.1. Extraktion mit RCLB, WCLB und Lytikase

In dieser Arbeit wurde versucht die von *Einsele et al.* entwickelte Extraktionsmethode (s. 2.2.2.1.) (85) zu modifizieren, um die Durchführung der Extraktion, der PCR und des PCR-Elisa's an einem Arbeitstag zu ermöglichen. Bei dieser Methode wurden RCLB, WCLB und Lytikase nacheinander in verschiedenen Inkubationszeiten mit den Proben vermengt. Die im WCLB enthaltene, aus *Tritirachium album* isolierte Proteinase

K weist im Gegensatz zu anderen Endopeptidasen keine Spezifität für bestimmte Aminosäuresequenzen auf und wird nicht durch Metall-Ionen oder Chelatbildner wie z.B. EDTA inhibiert. Eine höhere Proteaseaktivität, d.h. eine Zersetzung der Proteine bis hin zu den einzelnen Aminosäuren, wird unter Zugabe von SDS erreicht (50). Die im dritten Schritt dieser Methode verwendete rekombinante Lytikase wurde ursprünglich aus *Arthrobacter luteus* isoliert. Sie wandelt die Pilzzellen in sogenannte Sphäroplasten, das sind Pilzzellen mit angedauter, instabiler Zellwand, die dann leichter zu lysieren sind, um, indem sie Glucose-Polymere mit β -1,3 Bindung wie z.B. Glucan, ein Bestandteil der Hefezellmembran, hydrolysiert (50).

Die Extraktion aus Plasma hat sich leider nicht bewährt. Sie ist mit einem Sensitivitätsverlust verbunden, da die Pilzzellen beim Zentrifugieren zur Erstellung des Plasmas mit den Blutzellen im Pellet verbleiben und nur die freie Pilz-DNA im Plasma nachgewiesen werden kann (87).

Die Proben sollten im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden, da bei dieser Temperatur der Abbau der DNA am geringsten ist (87).

4.1.2. Extraktion mit Triton X 100 oder Saponin

Um die WCLB-Inkubation auslassen zu können, und dadurch etwa eine Stunde an Zeit zu gewinnen, wurde dem RCLB Triton-X-100 bzw. Saponin beigemischt, in der Hoffnung, dass so Erythrozyten und Leukozyten in einem Arbeitsschritt lysiert werden können. Im Tritonansatz konnte leider keine Sensitivitätssteigerung verzeichnet werden. Da alle Proben aus der Saponin-Reihe negativ waren muss davon ausgegangen werden, daß das Saponin entweder die Extraktion oder die Aufreinigung der Proben, die PCR oder den PCR-Elisas inhibiert. *Auch Cruz-Perez et al* haben die Präsenz von PCR-Inhibitoren verdeutlicht (25).

4.1.3. Zentrifugieren bei 13.000 U/min

Mit zwei weiteren Versuchsansätzen und unter Verwendung einer größeren Zentrifugalkraft (13.000 U/min) wurde ebenfalls versucht die Sensitivität der Extraktion zu steigern, in der Hoffnung, somit weniger Pilz-DNA mit dem Überstand zu verwerfen. Dazu mussten aber kleinere Cups verwendet werden, was leider mit einem Sensitivitätsverlust einherging, da entweder von vorneherein mit einer geringeren Blutmenge gearbeitet werden musste, oder Zellmaterial beim Umfüllen in die kleineren Cups verloren ging.

Bei der Probenreduktion beim RCLB-Schritt reichte das 1:1 Verhältnis für die Erythrozytenlyse nicht aus, da die Proben nach dem zweiten RCLB-Durchgang noch viel zu rot waren. Außerdem werden jeweils 4 ml der Blutproben und damit 4/5 der Pilz-DNA verworfen. Da die nur vereinzelt im Blut vorhandenen Pilzzellen unter Umständen nicht mit diesem einen ml aufgenommen werden, kann eine beginnende Infektion eventuell übersehen werden. Dieser Sensitivitätsverlust zeigte sich auch deutlich in den Ergebnissen dieser Testreihe.

Bei der Probenreduktion während des WCLB-Schrittes sollten jeweils 5 ml der Blutproben verwendet und trotzdem die größere Zentrifugalkraft (13.000 U/min) genutzt werden. Auch dieses Verfahren hat im Vergleich zur Routine zu einem Sensitivitätsverlust geführt. Ähnlich wie im vorigen Versuchsansatz werden WCLB und Lytikase in einem ungünstigeren Volumenverhältnis eingesetzt. Zudem kann bei jeder Übertagung der Probe in ein anderes Gefäß DNA verloren gehen.

4.1.4. Probenvolumen

Um zu überprüfen, wie sich ein kleineres Probenausgangsvolumen auf die Sensitivität auswirkt wurden die Proben einer Verdünnungsreihe in ungleiche Volumina (500µl versus 4,5ml) aufgeteilt und untersucht.

Die Ergebnisse haben deutlich gezeigt, dass die Probenvolumenreduktion auf 500 µl mit einem erheblichen Sensitivitätsverlust einhergeht. *Becker et al. (3)* haben eine ähnliche Studie durchgeführt in dem sie Volumina von 0.1 bis 2.5 ml verglichen haben. Ihre Identischen Ergebnisse erklärten sie damit, dass mit dem größeren Blutvolumen auch zu viel konkurrierende DNA oder andere inhibierende Substanzen übernommen werden.

4.1.5. Gesamte Extraktion

Die Versuche zur Extraktion haben gezeigt, dass die Methode mit RCLB, WCLB und Lytikase, mit niedrigerer Zentrifugalkraft, dafür aber mit größeren Ausgangsvolumina wie unter 2.2.2.1. beschrieben die besten Ergebnisse lieferte. Diese Methode wurde zur Extraktion der Pilz-DNA für den PCR-Elisa als auch für das LightCycler-Verfahren angewendet.

4.2. Aufreinigung des Extraktionsproduktes

Die Aufreinigung der DNA von Mikroorganismen wie *Candida albicans* oder *Aspergillus fumigatus* ist kompliziert und zeitaufwendig. Verschiedene arbeitsintensive Methoden zur Extraktion von *Candida* DNA aus Blut und Serum wurden entwickelt, wie die mechanische Zersetzung der *Candida*-Zellen gefolgt von Protein-Digestion und DNA-Reinigung mit Phenol-Chloroform. *Burnie et al. (19)* behandelten Serumproben mit Lysis-buffer und chaotropen Salzen wie Guanidium-Thiocyanat, und anschließender DNA-Ausfällung mit Natriumacetat und Isopropanol. *Chryssanthou et al.* benutzten Proteinase K und Natriumdodecylsulfat zur Proteindenaturierung und extrahierten die DNA aus dem Serum mittels Phenolchloroform.

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene DNA-Aufreinigungskits im Hinblick auf Sensitivität und Zeitaufwand miteinander verglichen.

Das QIAamp Kit stellt eine standardisierte Methode dar und übertrumpft komplizierte Extraktionsmethoden durch Verwendung von sterilen Fertigsäulchen zur Aufreinigung von DNA. Diese Säulchen enthalten eine Silicamembran, die in Gegenwart chaotroper Salze die ausgefällte DNA fixiert und nach dem Durchspülen von den restlichen Verunreinigungen durch die Poren der Membran die DNA durch pH-Erhöhung wieder freigibt.

Bei der etwa halbstündigen DNA-Aufreinigung (je nach Probenanzahl) werden keine gefährlichen Reagenzien mehr gebraucht. QIAamp ist zwar teurer als andere Aufreinigungsmethoden, aber sie erlaubt auch die Bearbeitung von mehreren Proben pro Zeiteinheit. *Dixon et al.* bezeichnete diese DNA-Extraktion als die Methode der ersten Wahl.

Das High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche basiert auf der selben oben beschriebenen Methode (2.2.3.2.). Die Ergebnisse fielen in Bezug auf Sensitivität zumindest im PCR-Elisa auch ähnlich aus, im Light Cycler wird aber doch ein Sensitivitätsverlust zu Lasten des Roche-Kits erkennbar.

Die Aufreinigung unter der Verwendung der drei Kits von peq-lab gehen alle mit beachtlichen Sensitivitätsverlusten einher, was auf die Überführung in neue Cups zurückzuführen sein könnte.

4.3.

PCR

Mit der Entwicklung der PCR zur automatisierten in vitro Amplifikation definierter DNA-Stücke steht eine sensitive, spezifische und schnelle Nachweismethode für pathogene Organismen zur Verfügung (18, 142). Mit dieser Methode kann nicht nur eine Aussage über das Vorhandensein bestimmter Erreger, sondern auch über die Quantität und Spezies des Erregers gemacht werden (85). Aufgrund der geringen Pilzlast im Blut bei immuninkompetenten Patienten, und der Notwendigkeit der Verwendung einer sensitiven Methode, kommt der PCR-Diagnostik eine große

Bedeutung zu, da herkömmliche Methoden wie die Blutkulturen bei z.B. hepatolienaler Candidiasis oder bei der invasiven Aspergillose, selten positive Ergebnisse liefern können. Die BAL kann neben Blut auch zur Diagnostik der frühen Aspergillose herangezogen werden. Im Falle einer vermuteten invasiven Aspergillose sollte für die PCR Blut und BAL verwendet werden um die Sensitivität zu erhöhen (16, 17, 23, 132, 134). Die Befürchtung, die Proben könnten durch *Candida albicans*, ein Pilz, der im Mundraum zur Normalflora gehört, kontaminiert werden, konnte nicht bestätigt werden (6, 15, 73, 85).

Schwierigkeiten, die sich im Rahmen der PCR-gestützten Pilzdiagnostik ergeben können sind Kontamination, Co-Amplifikation von humaner DNA und Nichtanwendbarkeit auf humanen Materialien (141). Die letzteren Punkte müssen bei der Evaluierung einer neuen Methode und bei der Wahl der Zielsequenz und der Primer berücksichtigt werden, während die Kontamination bei jedem Anwenden der PCR in Form der Negativkontrolle ausgeschlossen werden kann. Falsch negative Ergebnisse, können die Folge von Inhibitoren der Polymerase, von Chelatbildung der Magnesiumionen oder von DNase-Aktivität sein. Durch das Mitführen einiger Positivproben können auch diese Fehler erkannt werden (85).

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich ein etwa 500 bp langes Fragment einer hochkonservierten Sequenz aus der 18S Untereinheit der ribosomalen RNA der Pilze amplifiziert. Diese Sequenz wurde durch Mutation kaum modifiziert, so dass sie nahezu in allen Pilzarten noch in ihrer Urform zu finden ist, und somit die Detektion und die Identifizierung von Pilzen aus einem breiten Spektrum erlaubt.

4.3.1. Primer

Durch den Einsatz von universellen Primern, die in konservierten Regionen des multi-copy-Genes der 18 ssu rDNA binden, konnte die Anzahl und damit die Sensitivität detektierbarer Pilzspezies deutlich gesteigert werden (18). *Chen et al.* gehen sogar davon aus, dass Protokolle, mit multi-copy-Genen als Zielsequenz die größte

Sensitivität aufweisen (23). Durch die Wahl spezies-spezifischer Oligonukleotide wie Asp sp oder C.alb sp. Jeweils in Kombination mit Fung 2 lässt sich die Spezifität beeinflussen (87).

Aufgrund des nahen Verwandtschaftsgrades kann mit dem C.alb sp.-Primer nicht zwischen *Candida albicans* und *Candida tropicalis* unterschieden werden.

Wenn der Rückwärtsprimer ebenfalls durch einen speziesspezifischen- ersetzt wird, wie in dem Versuchsansatz mit Aspspez 1 + 2 (*Aspergillus fumigatus* retrotransposon) dann kann die Spezifität noch weiter erhöht werden, da dann das komplette Amplifikat innerhalb der speziesspezifischen Region zu finden ist. Eine Steigerung der Spezifität geht aber mit einer Verminderung der Sensitivität einher, was in dieser Versuchsreihe deutlich zu sehen war.

4.3.2. Multiplex-PCR

Bei einer Multiplex PCR werden mehrere Primerpaare pro Probe verwendet. In diesem Versuch kamen der Asp sp.- und der C.alb sp.- Vorwärtsprimer jeweils mit dem unspezifischen Rückwärtsprimer Fung 2 zum Einsatz. Wenn man die Primer so auswählt, dass verschiedenlange PCR-Produkte entstehen, können diese im Gel dann auch sicher unterschieden werden.

Die Multiplex PCR ist in der Lage multiple Pilze in einer Probe gleichzeitig zu diagnostizieren und somit die Identifikationszeit für Pilze von etwa 1-3 Tagen auf etwa 8 h zu reduzieren.

4.3.3. Nested PCR

Durch die Erhöhung der Zyklen-Anzahl eines PCR-Laufes kann die Sensitivität gesteigert werden. Allerdings nimmt die Aktivität der Polymerase proportional zur

Zyklen-Anzahl ab. Ein eleganter Kompromiss stellt die Nested-PCR dar, indem das erste PCR-Produkt mit neuem PCR-Mix und damit neuer Polymerase erneut amplifiziert wird.

Die Wahl der Polymerase hat Auswirkungen auf die Sensitivität. Wenn die Polymerase in der Primerregion fehlerhaft arbeitet und dort eine Mutationen in den neuen Strang einbaut, dann können von diesem Strang ausgehend keine weiteren DNA Stränge mehr amplifiziert werden. Dies spielt zu Beginn einer Infektion eine Rolle, wenn in der Probe nur wenig DNA-Material vorliegt. Für die nested PCR sollte die Pfu-Polymerase (gewonnen aus dem thermostabiles Bacterium *Pyrococcus furiosus*) besser geeignet sein als die Taq-Polymerase, da sie bei häufiger Zyklen-Wiederholung oder bei langen Amplifikaten gegenüber der Taq-Polymerase (*Bacterium Thermus aquaticus*) eine geringere Fehlerrate aufweisen sollte. Somit steige die Spezifität, da weniger fehlerhafte DNA-Stänge entstünden, und damit auch weniger unspezifische Banden im Gel zu finden seien. Außerdem dulde die Pfu-Polymerase höhere Temperaturen, was bei der Denaturierung cytosin- und guaninreicher Ziel-DNA von Bedeutung ist, denn diese Nukleotide können drei statt zwei Wasserstoffbrückenbindungen eingehen.

Die Verwendung der Pfu-Polymerase in diesen Versuchsreihen lies eine fragliche Sensitivitätssteigerung erkennen, denn leider waren selbst die Negativproben auch unter der Verwendung verschiedener Chargen leicht positiv, so dass von einer Kreuzreaktion mit Human-DNA oder einer Verunreinigung ausgegangen werden muss.

4.4. Quantifizierung

4.4.1. DIG-labeling PCR-Elisa

Die PCR-ELISA-Methode stellt ein schnelles Quantifizierungssystem dar (23). Die Arbeitszeit beläuft sich zwar über knapp einen Arbeitstag, mit mehreren Inkubationsschritten, teilweise von dreistündiger Dauer, hält sich der Arbeitsaufwand

jedoch in Grenzen. Die Dauer der ersten Inkubation ermöglicht die bessere Unterscheidung zwischen positiven und negativen Proben (85).

Es lassen sich parallel mehrere Sonden einsetzen, wobei die Hybridisierungslösung der Candida-Sonde 30 % DMSO enthalten sollte, um eine Steigerung der Spezifität zu erreichen (129).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben mit dieser Methode eine Sensitivität von bis zu 10 fg DNA/ml und somit bessere Ergebnisse als die kulturelle Anzucht der Pilze erreicht (91, 93, 41, 42, 45).

4.4.2. Detection Test Strips

Die DNA Detection Test Strips basieren auf dem selben Prinzip wie der PCR-Elisa, nur kann das Ergebnis bereits nach 10 min abgelesen werden.

Wie beim Elisa können auch hier verschiedene Sonden verwendet werden. Mit der Aspergillussonde werden Konzentrationen bis 10^0 CFU erkannt während Candida-Negativ- und Humanproben negativ bleiben. Die Candida Sonde kann wie beim PCR-Elisa als Common-fungal-Sonde eingesetzt werden. Auch hier bleiben Negativ- und Humanproben negativ.

4.5. Light Cycler™

Real-time PCR assays, wie das Light-cycler System, ermöglichen eine standardisierte, schnelle, akkurate und reproduzierbare in vitro Amplifizierung und real-time Quantifizierung (68, 92). Die Dauer der PCR wird mit diesem System aufgrund des günstigen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses, des kleineren Volumens, der Luft als Temperaturmedium und der angeschlossenen Computersoftware von etwa 4h auf 45 min verkürzt (84, 92, 129). Somit kann das Ergebnis innerhalb eines Arbeitstages

vorliegen (92, 149). Das LightCycler-System erlaubt die Analyse von 32 Proben in einem Lauf. Außerdem ist dieses Gerät zur Mutationsdetektion in der Lage und damit hervorragend zum molekularbiologischen Monitoring bei gefährdeten Patienten geeignet (50, 92) und wird bereits in der klinischen Routine zum schnellen Nachweis von pathogenen Organismen eingesetzt (88, 137).

Mit zwei Sondenpaaren in einem LightCycler-Lauf können mehrere Pilzspezies identifiziert bzw. ausgeschlossen werden. Mit dem LightCycler-Color-Compensation-Verfahren steht ein einfaches, zeitsparendes und damit für die Routinediagnostik geeignetes Verfahren zur Verfügung,

Spiess et al sind zu dem Schluss gekommen, dass die LC-Diagnostik aufgrund der geringeren Sensitivität gegenüber der nested-PCR eher zur Quantifizierung der Pilzlast in positiven klinischen Proben geeignet ist (134).

4.5.1. LightCycler und PCR-Elisa im Vergleich

Diagnostikmethoden wie PCR-Elisa und das LightCycler-Verfahren, die auf dem Nachweis von Nukleinsäure basieren, sind der konventionellen Diagnostik im Hinblick auf Sensitivität, Schnelligkeit (23) und Vielzahl der diagnostizierbaren Spezies überlegen (140). Im Hauptteil dieser Arbeit wurde die LightCycler- mit der PCR-Elisa – Methode anhand von 846 Blutproben von Patienten nach Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation verglichen.

Bei beiden Methoden kann eine zunächst durch hitzelabile „blocking groups“ geblockte Polymerase verwendet werden, so kann bei beiden Verfahren die Extension ungewollten Primerbindungen verhindert werden und dadurch eine Spezifitätserhöhung erreicht werden.

Die Vorteile der LightCycler-Methode gegenüber der PCR-Elisa-Methode sind das gesenkte Kontaminationsrisiko, da die Kapillaren nach dem Verschließen nicht mehr geöffnet werden müssen, das kleinere Volumen der Proben, Luft als Temperaturübertragungsmedium was schnellere Temperaturänderungen und somit auch

kürzere Zyklen erlaubt. Eine quantitative und qualitative Analyse der Messergebnisse und deren Dokumentation während des LightCycler-Laufes ist durch eine angeschlossenen Computersoftware möglich. Daraus resultiert ein enormer Zeitgewinn, da eine Quantifizierungsmethode, wie der Elisa, nicht mehr nötig ist.

Von insgesamt 171 stammzelltransplantierten Patienten wurden 846 Blutproben mit der PCR-Elisa- und der LightCycler-Methode auf Candida- und Aspergillus-DNA untersucht. Von den 120 PCR-Elisa positiven Proben waren 30 (25%) ebenfalls in der LightCycler-Methode positiv ausgefallen. Mit dem LightCycler-Verfahren konnten 46 Proben positiv getestet werden, von denen 30 (65,22%) Testergebnisse ebenfalls im PCR-Elisa-Verfahren positiv ausfielen. 740 (87,47 %) Resultate stimmten überein, während 106 (12,53 %) Testergebnisse im Vergleich unterschiedlich ausfielen. Diese Zahlen machen deutlich, dass mit dem PCR-Elisa-Verfahren insbesondere im Bereich niedriger Pilzlast wesentlich mehr Proben als positiv registriert werden als mit dem LightCycler-Verfahren. Jedoch kann noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob die im Elisa positiv getesteten Proben auch wirklich Pilz-DNA enthielten oder ob die LightCycler-Methode die näher an der Realität liegenden Ergebnisse lieferte. Deshalb wurde der klinische Verlauf von 51 Patienten, deren Blut mindestens dreimal mit der LightCycler-Methode untersucht worden war, und dabei mindestens eine Probe Pilz-DNA enthielt, ausgewertet. 59 Proben dieser Patienten ergaben mit der PCR-Elisa-Methode ein positives- jedoch mit der LightCycler-Methode ein negatives Ergebnis. Im Vergleich mit den klinischen Angaben fielen 12 Proben auf, deren Abnahmedatum mit einer Temperaturerhöhung, einem Pilznachweis in einer Kultur oder einem positiven bildgebenden Befund im zeitlichen Zusammenhang stehen. Bei 47 Proben konnte keiner der oben genannten Befunde zur Zeit der Blutabnahme erhoben werden.

4.5.1.1. Zeitpunkt der erstmaligen Reaktivierung im Vergleich

Von 51 Patienten konnten bei 11 Patienten sowohl mit der LC- als auch mit der PCR-Elisa-Methode im gesamten Verlauf Proben als positiv detektiert werden. Bei diesen Patienten wurde in beiden Nachweisverfahren der Zeitpunkt der ersten positiven Blutprobe bestimmt. Tabelle 59 macht deutlich, dass die PCR-Elisa-Methode im Vergleich der ersten Positivbestimmung im Krankheitsverlauf der Patienten, die früheren Positivergebnisse lieferte.

4.5.1.2. Therapiesteuerung

Im Rahmen dieser Aktenauswertung wurde auch die Eignung des LightCyclers zur Steuerung antimykotischer Therapien untersucht. Dabei wurde die Abnahme der Pilzlast während einer antimykotischen Therapie nach initial positiven Resultaten beurteilt.

Von 51 beobachteten Patienten wurden 30 antimykotisch behandelt und davon wiesen 5 ein LC-positives Ergebnis in ihrem Beobachtungszeitraum auf. Aus Tabelle 60 kann ersehen werden, dass jeweils eine Woche nach Therapiebeginn die LightCycler-Ergebnisse wieder negativ bleiben. Es wird auch hier deutlich, dass die LightCycler-Methode bei niedriger Pilzlast, und das wird von einer antimykotischen Therapie erwartet, selten positive Ergebnisse liefert.

4.5.1.3. Klinischer Vergleich

Bei 51 Patienten wurden zur Beurteilung des klinischen Verlaufes die Krankenakten ausgewertet. Von diesen 51 Patienten erkrankten 7 an einer vermuteten invasiven Pilzinfektion. Außerdem erlitten 3 von 51 Patienten eine gesicherte invasive

Pilzinfektion. Aus Tabelle 61 ist zu ersehen, dass bei gesicherten invasiven Pilzinfektionen die LightCycler-Methode bei zu erwartender hoher Pilzlast positive Ergebnisse liefert, während bei vermuteten invasiven Pilzinfektionen mit eher niedriger Pilzlast die PCR-Elisa-Methode zu positiven Ergebnissen kommt.

4.5.2. Common-Pilz-Sonde

Zusätzlich wurden 192 Proben mit einer unspezifischen Light-Cycler-Sonde analysiert, die die DNA vieler Pilzarten detektieren kann. Die common Pilz Sonde wurde verwendet um Erfahrungen zu sammeln, inwieweit auch andere Pilze außer *Aspergillus fumigatus* und *Candida spp.* zu einer Pilzinfektion bei KMT-Patienten führen. 6 Proben, die im Elisa negativ waren, haben mit dieser Sonde ein positives Ergebnis geliefert.

5.

Zusammenfassung

Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen oder Patienten nach Transplantationen sind gefährdet, sich eine lebensbedrohliche Pilzinfektion zuzuziehen (16). Mit einer möglichst früh eingeleiteten antimykotischen Therapie kann die Morbidität und die Mortalität dieser Patienten herabgesetzt werden (11, 126). Dazu ist eine rasche, sensitive und speziesidentifizierende Diagnostik von großer Bedeutung (11, 26, 62, 136, 139).

Das Ziel dieser Arbeit war es in erster Linie die LightCycler-Methode und die PCR-Elisa-Methode, aber auch andere Methoden, für die Routinediagnostik von Pilzen so anwendbar zu machen, dass der Verlust an Sensitivität und Spezifität möglichst gering gehalten wird, trotzdem aber am Tag der Blutentnahme ein Ergebnis vorliegen kann. Zunächst wurde die Extraktion bezüglich Probenvolumen, Pufferansätzen, Zentrifugendrehzahl und Verwendung verschiedener Aufreinigungskits so moduliert, dass eine Reduktion des Zeitaufwandes möglich werden sollte. Zur Verbesserung der PCR, wurde ausprobiert, inwieweit verschiedene Primer, Primerkombinationen, die gleichzeitige Anwendung der Primerpaare in einer sogenannten Multiplex-PCR und die Erhöhung der Zyklenanzahl unter Verwendung einer dafür geeigneten Polymerase mittels einer sogenannten nested-PCR zu einer Steigerung der Spezifität und zu einer Zeitaufwandverringerung beitragen können. Die Detection Test Strips als schnelle und aufwandarme Methode der Pilzdiagnostik wurden anhand von Patientenproben mit dem PCR-Elisa verglichen. Im Hauptteil der Arbeit wurde anhand von 846 Blutproben von Patienten nach Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation die LightCycler-Methode mit der PCR-Elisa-Methode verglichen. Teilweise wurden dabei verschiedene LightCycler-Sondenkombinationen verwendet, mit denen man in einem Lauf verschiedene Pilzspezies spezifisch detektieren kann.

Die Versuche zur Extraktion haben gezeigt, dass die Methode mit RCLB, WCLB und Lytikase, mit niedrigerer Zentrifugalkraft, dafür aber mit größeren Ausgangsvolumina wie unter 2.2.2.1. beschrieben die besten Ergebnisse lieferte. Diese Methode wurde zur Extraktion der Pilz-DNA für den PCR-Elisa als auch für das LightCycler-Verfahren angewendet. In dieser Arbeit wurden außerdem fünf verschiedene DNA-Aufreinigungskits im Hinblick auf Sensitivität und Zeitaufwand miteinander verglichen.

Die Ergebnisse fielen in Bezug auf Sensitivität im Vergleich zwischen den Qiagen- und Roche-Kits zumindest im PCR-Elisa ähnlich aus, im Light Cycler wird aber doch ein Sensitivitätsverlust zu Lasten des Roche-Kits erkennbar. Die Aufreinigung unter der Verwendung der drei Kits von peq-lab gehen alle mit beachtlichen Sensitivitätsverlusten einher, was auf die Überführung in neue Cups zurückzuführen sein könnte.

Die Multiplex PCR ist in der Lage multiple Pilze in einer Probe gleichzeitig zu diagnostizieren und somit die Identifikationszeit für Pilze von etwa 1-3 Tagen auf etwa 8 h zu reduzieren. Wenn man spezifische Primer so auswählt, dass verschiedenlange PCR-Produkte entstehen, können diese im Gel dann auch sicher unterschieden werden. Die theoretisch für die nested-PCR besser geeignete Pfu-Poymrease lieferte in unseren Versuchen leider schlechtere Ergebnisse als die Taq-Polymerase.

Im Hauptteil dieser Arbeit wurde die LightCycler- mit der PCR-Elisa –Methode anhand von 846 Blutproben von Patienten nach Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation verglichen. Bei beiden Methoden kann eine zunächst durch hitzelabile „blocking groups“ geblockte Polymerase verwendet werden, so kann bei beiden Verfahren die Extension ungewollten Primerbindungen verhindert werden und dadurch eine Spezifitätserhöhung erreicht werden. Ebenfalls können bei beiden Verfahren mit zwei Sondenpaaren in einem Lauf mehrere Pilzspezies identifiziert bzw. ausgeschlossen werden.

Im Vergleich der Ergebnisse dieser Studie wird deutlich, dass der PCR-Elisa im Bereich niedriger Pilzlast im Blut wesentlich häufiger positive Ergebnisse liefert, teilweise auch ohne klinisches Korrelat, der LightCycler aber eher im Bereich höherer Pilzlast Pilze im Blut detektiert.

Die PCR- ist zur Screening-Blutuntersuchung besonders geeignet, da sie durch eine ausgezeichnete Sensitivität besticht, die LightCycler-Diagnostik ist aufgrund der geringeren Sensitivität gegenüber des PCR-Elisa´s eher zur Quantifizierung der Pilzlast in positiven klinischen Proben geeignet.

6.

Literatur

1. Bacigalupo A., Mordini N., Pitto A., Piaggio G., Podesta M., Benvenuto F., van Lint M.T., Valbonesi M., Lercari G., Carlier P., Lamparelli T., Gualandi F., Occhini D., Bregante S., Figari O., Soracco M., Vassallo F., De Stefano G. (September 1997):
"Transplantation of HLA-mismatched CD34+ selected cells in patients with advanced malignancies: Severe immunodeficiency and related complications."
Br J Haematol 98 (3): S. 760 - 766
2. Barnes A.J., Oppenheim B.A., Chang J., Morgenstern G.R., Scarffe J.H. (1999):
"Early investigation and initiation of therapy for invasive pulmonary aspergillosis in leukaemic and bone marrow transplant patients."
Mycoses 42 (5-6): 403-408
3. Becker M.J., de Marie S., Willemse D., Verbrugh H.A., Bakker-Woudenberg I.A.J.M. (2000):
"Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model."
Journal of Clinical Microbiology Vol. 38, No 4, 1434-1438
4. Benjamin D.K.Jr., Miller W.C., Bayliff S., Martel L., Alexander K.A., Martin P.L. (2002):
"Infections diagnosed in the first year after pediatric stem cell transplantation".
Pediatric Infectious Diseases März; 21 (3): 227 - 234
5. Berenguer J., Allende M.C., Lee J.W., Garrett K., Lyman C., Ali N.M., Bacher J., Pizzo P.A., Walsh T.J. (1995):
"Pathogenesis of pulmonary aspergillosis: granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone-induced immunosuppression."
American Journal of Respiratory and Critical Care Meicine 152: 1079-1086
6. Bialek R., Moshous D., Casanova J.L., Blanche S., Hennequin C. (2002):
"Aspergillus antigen and PCR assays in bone marrow transplanted children."
Eur J Med Res 30;7(4):177-180

7. Bille J. (1995):
"Systemic mycotic infections: Epidemiology and diagnostic criteria."
Schweiz Med Wochenschr Jun 10; 125 (23): 1123 - 1129

8. Bodey G. P. (1992):
„Azole antifungal agents.”
Clinical infectious diseases 14:5161-5169

9. Bodey G.P. & Varativarian S. (1989):
"Aspergillosis"
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 8:413-437

10. Bodey G.P., Bueltmann B., Duguid W., Gibbs D., Hanak H., Hotchi M., Mall G., Martino P., Meunier F., Milliken S., Naoe S., Okudaira M., Scevola D., van't Wout J. (1992):
"Fungal infections in cancer patients: An international autopsy survey."
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 11: 99-109

11. Bohme A., Karthaus M., Hoelzer D. (1999):
"Antifungal prophylaxis in neutropenic patients with hematologic malignancies: is there a real benefit?"
Chemotherapy May-Jun; 45 (3): 224-232

12. Botterel F., Desterke C., Costa C., Bretagne S. (2001):
“Analysis of Microsatellite Markers of Candida albicans Used for Rapid Typing.”
Journal of Clinical Microbiology Vol. 39, No. 11 S. 4076-4081

13. Bow E.J., Laverdiere M., Lussier N., Rotstein C., Cheang M.S., Ioannoun S. (2002):
"Antifungal prophylaxis for severely neutropenic chemotherapy recipients: a meta analysis of randomized controlled clinical trials"
Cancer 15; 94 (12): 3230-3246

14. Brenier-Pinchart M.P., Lebeau B., Devouassoux G., Mondon P., Pison C., Ambroise-Thomas P., Grillot R. (1998):
"Aspergillus and lung transplant recipients: A mycologic and molecular epidemiologic study."
J Heart Lung Transplant Oct; 17 (10): 972 - 979

15. Bretagne S., Costa J.M., Marmorat- Khuong A., Poron F., Cordonnier C., Vidaud M., Fleury-Feith J. (1995):
"Detection of Aspergillus species DNA in bronchoalveolar lavage by competitive PCR."
Journal of Clinical Microbiology 33: 1164-1168

16. Buchheidt D., Baust C., Skladny H., Baldus M., Brauninger S., Hehlmann R. (2002):
"Clinical evaluation of a polymerase chain reaktion assay to detectAspergillus species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients."
Br J Haematol 116 (4) 803-811

17. Buchheidt D., Baust C., Skladny H., Ritter J.,Suedhoff T., Baldus M., Seifarth W., Leib-Moesch C., Hehlmann R. (2001):
"Detection of aspergillus species in blood and bronchoalveolar lavage samples fromimmunocompromised patiennts by means of 2-step polymerase chain reaction: Clinical result."
Clinical infectious diseases 33 : 428-435

18. Buchman T.G., Rossier M., Merz W.G., Charache P. (1990):
"Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification, part 1: Rapid identification of Candida albicans by in vitro amplification of a fungus-specific gene."
Surgery 108: 338-347

19. Burnie J. P., Golbang N., Mathews R. C. (1997):
"Semiquantitative polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosis of disseminated candidiasis."
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 16:346-350

20. Caillot, D., Casanovas O., Bernard A., Couaillier J. F., Durand C., Cuisenier B., Solary E., Piard F., Petrella T., Bouuiu A., Couillau H. G., Dumas M., Guy H. (1997):
„Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery.“
J. Clin. Oncol. 15: 139-147

21. Casson D. H., Riordan F. A., Ladusens E. J. (1996):
"Aspergillus endocarditis in chronic granulomatous disease."
Acta Paediatr. 85:758-759

22. Chen R.S., Tsay J.G., Huang Y.F., Chiou R.Y. (2002):
"Polymerase chain reaction-mediated characterization of molds belonging to the aspergillus flavus group and detection of aspergillus parasiticus in peanut kernels by a multiplex polymerase chain reaction."
J Food Prot May; 65 (5): 840 - 844

23. Chen S.C., Hallyday C.L., Meyer W. (2002):
"A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays."
Med Mycol Aug 40 (4): 333-357

24. Chen Y.C., Chang S.C., Sun C.C., Yang L.S., Hseih W. C., Luh K. T. (1997):
"Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993."
Infect. Control Hosp. Epidemiol. 18: S.369-375

25. Cruz-Perez P., Buttner M.P., Stetzenbach L.D. (2001):
"Detection and quantitation of aspergillus fumigatus in pure culture using polymerase chain reaction."
Molecular Cell Probes 15(2):81-88

26. De Baere T., Claeys G., Swinne D., Verschraegen G., Muylaert A., Massonet C., Vaneechoutte M. (2002):
"Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region (ITS2)."
BMC Microbiol Jul 25; 2 (1): 21

27. De Repentigny L., Marr L. D., Keller J. W., Carter A. W., Kuykendall R. J., Kaufman L., Reiss E. (1985):
"Comparison of enzyme immunoassay and gas-liquid chromatography for the rapid diagnosis of invasive candidiasis in cancer patients."
Journal of Clinical Microbiology 21:972-979

28. Dean D.A., Kenneth W.B. (1996)
"Fungal infection in surgical patients"
American Journal of Surgery 171: 374-382

29. Denning D.W. (1991):
"Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host."
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 28, Suppl. B, 1 - 16

30. Denning D.W. (1996):
"Diagnosis and management of invasive aspergillosis"
Curr Clin Top Infectios Diseases. 16 : 277-299

31. Denning, D. W. (1996):
"Therapeutic outcome in invasive aspergillosis".
Clinical infectious diseases 23: 608-615

32. Denning D.W. (1998):
"Invasive aspergillosis"
Clinical infectious diseases 26:781-803

33. Denning D.W., Anderson M.J., Turner G., Latge J.P., Bennett J.W. (2002):
"Sequencing the Aspergillus fumigatus genome."
Lancet Infect Disea Apr.; 2 (4): 251 - 253

34. Denning D.W., Baily G.G., Hood S.V. (1997):
"Azole Resistance in Candida."
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 16,261-280

35. Denning D.W., Stevens D.A. (1990):
"Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2121 published cases."
Reviews of Infectious Diseases 12, 1147 - 1201

36. DeShazo R. D., Chapin K., Swain R. E. (1997):
"Fungal sinusitis."
New England Journal of Medicine 337:254-259

37. Dictar M.O., Maiolo E., Alexander B., Jacob N., Veron M.T. (2000):
"Mycoses in the transplanted patient".
Med Mycol 38 Suppl 1: 251-258

38. Dini G., Castagnola E., Comoli P., van Tol M.J., Vossen J.M. (2001):
"Infections after stem cell transplantation in children: State of the art and recommendations."
Bone Marrow Transplant Aug; 28 Suppl 1: 18 - 21

39. Duthie, R., Denning D.W. (1995):
"Aspergillus fungemia: report of two cases and review."
Clinical infectious diseases 20 : 598-605
40. Einsele H., Kanz L. (1999):
"Übersicht: Allogene Stammzelltransplantation"
Der Internist 40 (12) 1249-1256
41. Einsele, H., Hebart H., Roller G., Löffler J., Rothenhöfer I., Müller C. A.,
 Bowden R. A., van Burik J., Engelhard D., Kanz L., Schumacher U. (1997):
**„Detection and identification of fungal pathogens in blood by using
 molecular probes.“**
Journal of Clinical Microbiology 35 : 1353-1360
42. Elie C.M., Lott T.J., Reiss E., Morrison C.J. (1998):
**"Rapid identification of Candida species with species-specific DNA
 probes."**
Journal of Clinical Microbiology 36 (11), 3260-3265
43. Ferns R.B., Fletcher H., Bradley S., Mackinnon S., Hunt C., Tedder R.S. (2002):
**”The prospective evaluation of a nested polymerase chain reaction assay for
 the early detection of Aspergillus infection in patients with leukaemia or
 undergoing allograft treatment.”**
Br J Haematol 119(3):720-725
44. Fraser V.J., Joner M., Dunkel J., Storfer S., Medoff G.,
 Dunagan W.C. (1992):
**"Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors
 and predictors of mortality"**
Clinical Infectious Diseases 15: 414-421
45. Fujita S., Lasker B.A., Lott T.J., Reiss E., Morrison C.J. (1995):
**"Microtitrations plate enzyme immunoassay to detect
 PCR-amplified DNA from candida species in blood."**
Journal of Clinical Microbiology 33,962-967
46. Fujita S.I., Senda Y., Nakaguchi S., Hashimoto T. (2001):
**“Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and
 2 Regions for Rapid Detection and Identification of
 Yeast Strains.”**
Journal of Clinical Microbiology Vol. 39, No. 10 S. 3617-3622
47. Gabal M. (1992):
**"Developmant of a chromosomal probe for the laboratory
 diagnosis of Aspergillosis."**
Mycopathologica 106: 121-129

48. Golbang N., Burnie J.P., Matthews R.C. (1999):
"A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by aspergillus fumigatus."
J Clin Pathol 52(6):419-423
49. Groll A.H., Shah P.M., Mentzel C., Schneider M., Just-Nübling G., Hübner G. (1996):
"Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infection at a university hospital."
Journal of Infectious Diseases 33,23
50. Hagemeyer L.G.
"Molekularbiologische Untersuchung zur Azolresistenz bei Candida albicans und Candida tropicalis an Isolaten von immunsupprimierten Patienten"
Med. Dissertation, Universität Tübingen
51. Haynes K.A., Westerneng T.J. (1996):
"Rapid identification of Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis and C. krusei by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA."
Journal of Medical Microbiology 44,390-396
52. Haynes K.H., Westerneng T.J., Fell J.W., Moens W. (1995):
"Rapid detection and identification of pathogenic fungi by PCR amplification of large subunit rDNA".
Journal of Medical and Veterinary Mycology 33 (5); 319 - 325
53. Hebart H., Bokemeyer C., Löffler J., Schumacher U., Kanz L., Einsele H. (1997):
"New aspects for the diagnosis of invasive fungal disease in oncological patients."
Onkologie 20,99-104
54. Hebart H., Löffler J., Reitze H., Engel A., Schumacher U., Klingebiel T., Bader P., Bohme A., Martin H., Bunjes D., Kern W.V., Kanz L., Einsele H. (2000):
"Prospective screening by a panfungal PCR assay in patients at risk for fungal infections: Implication for the management of febrile neutropenia."
Br J Haematol 111 (2): 635-640
55. Hee Shin J., Nolte F.S., Morrisson C.J. (1997):
"Rapid identification of Candida species in blood cultures by a clinically useful PCR method."
Journal of Clinical Microbiology 35,1454-1459

56. Heinzl S. (1995):
"Amphotericin B"
in: Heinzl: Arzneimitteltherapie, Heft 11, Verlagsgesellschaft Stuttgart
57. Heizmann W.R., Döller P.C., Kropp S., Bleich S. (1997):
"Medizinische Mikrobiologie und Immunologie"
Schattauer-Verlag Stuttgart
58. Hendolin P.H., Paulin L., Koukila-Kähkölä P., Anttila V.-J., Malmberg H., Richardson M., Ylikoski J. (2000):
"Panfungal PCR and Multiplex Liquid Hybridization for Detection of Fungi in Tissue Specimens."
Journal of Clinical Microbiology, Vol. 38, No. 11, S. 4186-4192
59. Hengstmann J.H. (2001)
Infektionskrankheiten
in Baenkler H.-W., Fritze D., Fießl H.S., Goeckenjan G., Hamm C., Harenberg J., Hebe J., Hengstmann J.H., Hörl W.H., Klingmüller D., Köster R., Küchenhoff J., Kuck K.-H., Ludwig M.M., Matzdorff ., Nienaber C., Riede U.-N., Rösch W., Rudolf G., Schaefer H.-E., Schuchert A., Schweikert H.-U., Siebels J., Terres W., Wahl P., Ziegler R.:
"Innere Medizin"
Sonderausgabe Thieme Verlag, Stuttgart
60. Henry T., Iwen P. C., Hinrichs S. H. (2000):
„Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2.”
Journal of Clinical Microbiology 38:1510-1515
61. Horvath JA, Dummer S. (1996):
“The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis.”
American Journal of Medicine;100:171-178
62. Iwen P. C., Rupp M. E., Bishop M. R., Rinaldi M. G., Sutton D. A., Tarantolo S., Hinrichs S. H. (1998):
“Disseminated Aspergillosis Caused by Aspergillus ustus in a Patient Following Allogeneic Peripheral Stem Cell Transplantation.”
Journal of Clinical Microbiology, Vol. 36, No. 12; S. 3713-3717

63. Iwen P. C., Rupp M. E., Langnas A. N., Reed E. C., Hinrichs S. H. (1998):
„Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature.”
Clinical infectious diseases 26:1092-1097
64. Jaeger E. E. M., Carroll N. M., Choudhury S., Dunlop A. A. S., Towler H. M. A., Matheson M. M., Adamson P., Okhravi N., Lightman S. (2000):
“Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR.”
Journal of Clinical Microbiology 38:2902-2908
65. Jantunen E., Ruutu P., Niskanen L., Volin L., Parkkali T., Koukila-Kahkola P., Ruutu T. (1997):
"Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogeneic BMT recipients."
Bone Marrow Transplant 19 (8): 801-808
66. Jarvis R.W. (1995)
"Epidemiology of nosocomial fungal infections with emphasis on *Candida* species"
Clinical infectious diseases 20,1526-1530
67. Jones M.E., Fox A.J., Barnes A.J., Oppenheim B.A., Balagopal P., Morgenstern G.R., Scarffe J.H. (1998);
"PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillus infection in neutropenic patients."
J Clin Pathol 51(9):652-656
68. Kami M. (2001):
"Current approaches to diagnose invasive aspergillosis: Application of real-time automated polymerase chain reaction."
Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 42 (4): 181-188
69. Kappe R., Fauser C., Okeke C.N., Maiwald M. (1996):
"Univesal fungus-specific primer-system & group-specific hybridisation oligonucleotides."
Mycoses 39 (1-2): 25-30
70. Kappe R., Okeke C. N., Fauser C., Maiwald M., Sonntag H.-G (1998):
„Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue.”
Journal of Medical Microbiology 47:811-820

71. Karow T., Lang R.(2000):
"Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie"
8. Auflage Druckerei F.Hansen, Bergisch-Gladbach
72. Kawaraguchi Y., Kinouchi K., Fukumitsu K., Okawa M.,
 Kitamura S. (März 2002):
**"Intraoperative massive pulmonary hemorrhage due to
 pulmonary aspergillosis."**
Masui 51 (3): 277 - 279
73. Kawazu M., Kanda Y., Goyama S., Takeshita M., Nannya Y.,
 Niino M., Komeno Y., Nakamoto T., Kurokawa M., Tsujino S.,
 Ogawa S., Aoki K., Chiba S., Motokura T., Ohishi N., Hirai H.
 (2003) :
**"Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by
 quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage
 fluid."**
American Journal of Hematology 72 (1):27-30
74. Kayser F., (1998)
 Allgemeine Mykologie in Kayser F., Bienz K., Eckert J.,
 Zinkernagel R.:
Medizinische Mikrobiologie,
9.Auflage Thieme-Verlag Stuttgart
75. Klont R.R., Meis H.F., Verweij P.E. (2001):
**"Critical assessment of issues in the diagnosis of invasive
 aspergillosis."**
Clin Microbiol Infect 7Suppl 2: 32 - 37
76. Krcmery V., Krupova I., Denning D.W. (1999):
**"Invasive yeast infections other than candida spp. In acute
 leukaemia."**
Journal of Hospital Infection 41 (3), 181-194
77. Kruger W.H., Kroger N., Russmann B., Renges H., Kabisch H.,
 Zander A.R. (Dezember 1998):
**"Treatment of mycotic infections after haemopoietic progenitor
 cell transplantation with liposomal amphotericin-B."**
Bone Marrow Transplant 22 Suppl 4: S.10 - 13
78. Lass-Flörl C., Aigner J., Gunsilius E., Petzer A., Nachbaur D.,
 Gastl G., Einsele H., Löffler J., Dierich M.P., Würzner R. (2001):
**"Screening for aspergillus spp. using PCR of whole blood
 samples from patients with haematological malignancies."**
Br J Haematol; 113 (1): 180 - 184

79. Lass-Flörl C., Kofler G., Kropshofer G., Hermans J., Kreczy A., Dierich M.P., Niederwieser D. (1998):
"In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis."
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 42; 497 - 502
80. Latge´ J.P.(1999):
"Asprgillus fumigatus and aspergillosis."
Clinical Microbiology Reviews 12 (2) : 310-350
81. Law D., Moore C.B., Wardle H.M., Ganguli L.A., Keaney M.G., Denning D.W. (1994):
"High prevalence of antifungal resistance in Candida spp. from patients with AIDS"
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 34, 659-668
82. Lee J.D., Kolattukudy P.E. (1995):
"Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastinolytic aspartic proteinase from aspergillus fumigatus and evidence of ist secretion by the fungus during invasion of the host lung."
Infection and Immunity Oct; 63 (10): 3796 - 3803
83. Lewin Benjamin (2000):
"Genes"
Oxford University Press
84. Loeffler J., Hagemeyer L., Hebart H., Henke H., Schumacher U., Einsele H.(2000):
"Rapid Detection of Point Mutations by Fluorescence Resonance Energy Transfer and Probe Melting Curves in Candida Species."
Clinical Chemistry ;46:631-635
85. Löffler J. (1997):
"Etablierung und Evaluierung molekularbiologischer Nachweismethoden humanpathogener Pilze und Charakterisierung azolresistenter Pilzstämmen isoliert aus immunsuppremierten Patienten"
Dissertation, Universität Tübingen
86. Löffler J., Hebart H., Bialek R., Hagemeyer L., Schmidt D., Serey F.-P., Hartmann M., Eucker J., Einsele H., (1999)
"Contaminations Occurring in Fungal PCR Assays"
Journal of Clinical Microbiology 37 (4) 1200-1202

87. Löffler J., Hebart H., Brauchle U., Schumacher U., Einsele H. (2000):
"Comparison between plasma and blood Specimens for detection of aspergillus DNA by PCR"
Journal of clinical microbiology 38 (10) 3830-3833
88. Löffler J., Hebart H., Cox P., Flues N., Schumacher U., Einsele H. (2001):
"Nucleic acid sequence- based amplification of Aspergillus RNA in blood samples."
Journal of clinical Microbiology 1626-1629
89. Löffler J., Hebart H., Magga S., Schmidt D., Klingspor L., Tollemar J., Schumacher U., Einsele H. (2000):
"Identification of rare candida species and other yeasts by PCR and slot blot hybridisation."
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 38, 207-212
90. Löffler J., Hebart H., Schumacher U., Reitze H., Einsele H. (1997):
"Comparison of different methods for extaction of DNA of fungal pathogenes from culture and blood."
Journal of Clinical Microbiology 35(12):3311-3312
91. Löffler J., Hebart H., Sepe S., Schuhmacher U., Klingebiel T., Einsele H. (1998):
"Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-Elisa system."
Med Mycol 36,275-279
92. Löffler J., Henke N., Hebart H., Schmidt D., Magmeyer L., Schumacher U., Einsele H. (2000):
"Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system."
Journal of Clinical Microbiology 38 (2) 586-590
93. Loeffler J., Kloepfer K, Hebart H., Najvar L., Graybill J.R., Kirkpatrick W.R., Patterson T.F., Dietz K., Bialek R. Einsele H. (2002):
„Polymerase chain reaction detection of aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis“
Journal Infect Dis 15; 185(8):1203-6

94. Löffler J., Schmidt K., Hebart H., Schumacher U., Einsele H. (2002):
"Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC System"
Journal of Clinical Microbiology 38 (10) 3830-3833
95. Lorenz M.C., Fink G.R. (2001):
"The glyoxylate cycle is required for fungal virulence."
Nature July 5; 412 (6842): 83 – 86
96. MacMillan M.L., Goodman J.L., DeFor T.E., Weisdorf D.J. (2002):
"Fluconazole to prevent yeast infections in bone marrow transplantation patients: a randomized trial of high versus reduced dose, and determination of the value of maintenance therapy."
American Journal of Medicine 1; 112 (5): 369-379
97. Maertens J., Verhaegen J., Lagrou K., Van Eldere J., Boogaerts M. (2001):
"Screening for circulating galactomannan as a non-invasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation."
Blood, Vol. 97, No. 6, S. 1604-1610
98. Magga S.
"Evaluierung molekularbiologischer Untersuchungen zur spezifischen Identifikation und zur Azolresistenz von humanpathogenen Candida spezie"
Med. Dissertation, Universität Tübingen
99. Manfredini L., Garaventa A., Castagnola E., Viscoli C., Moroni C., Dini G., Garre M.L., Manno G., Savoli C., Kotitsa Z. (1995):
"Fungal infections in pediatric oncology."
Pediatr Med Chir Sept - Oct; 17 (5): 435 – 441
100. Mannarelli B.M., Kurtzman C.P. (1998):
"Rapid Identification of Candida albicans and other human pathogenic Yeasts by using short oligonucleotides in a PCR."
Journal of Clinical Microbiology, 36, (6) 1634-1641
101. Miles A. M., Barth R. H. (1995):
"Aspergillus peritonitis: therapy, survival, and return to peritoneal dialysis."
Am. J. Kidney Dis. 26:80-83

102. Miyachi M., Masukawa A., Ohshima T., Fusegawa H., Hirose T., Impraim C., Ando Y. (1998):
"Monitoring of inhibitors of enzymatic amplification in polymerase chain reaction and evaluation of efficacy of RNA extraction for the detection of hepatitis C virus using the internal control."
Clin Chem.Lab.Med 36,571-575
103. Morace G., Pagano L., Sanguinetti M., Posteraro B., Mele L., Equitani F., D'Amore G., Leone G., Fadda G. (1999):
"PCR-restriction enzyme analysis for detection of Candida DNA in blood from febrile patients with haematological malignancies."
Journal of Clinical Microbiology 37:1871-1875
104. Morace G., Sanguinetti M., Posteraro B., Cascio G. L., Fadda G. (1997):
"Identification of various medically important Candida species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis."
Journal of Clinical Microbiology 35:667-672
105. Moran G. P., Sullivan D. J., Henman M. C., McCreary C. E., Harrington B. J., Shanley D. B., Coleman D. C.(1997):
"Antifungal drug susceptibilities of oral Candida dubliniensis isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and nonHIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro."
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41:617-623
106. Nguyen M.H., Peacock J.E., Morris A.J., Tanner D.C., Nguyen M.L., Snyderman D.R., Wabener M.M., Rinaldi M.G., Yu V.L. (1996):
"The changing face of candidemia: emergence of non-Candida albicans species and antifungal resistance."
American Journal of Medicine 100:617-623
107. Nguyen M.H., Yu Ch.Y. (1998):
"Voriconazol against fluconazol-susceptible and resistant Candida isolates: In vitro efficacy compared with that of itraconazol and ketoconazol."
Journal of Antimicrobial Therapy 42,253-256
108. Nho S., Anderson M. J., Moore C. B., Denning D. W. (1997):
"Species differentiation by internally transcribed PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant Candida krusei, Candida inconspicua, and Candida norvegensis strains."
Journal of Clinical Microbiology 35:1036-1039

109. Nosari A., Oreste P., Cairoli R., Montillo M., Carrafiello G., Astolfi A., Muti G., Marbello L., Tedeschi A., Magliano E., Morra E. (2001):
"Invasive aspergillosis in haematological malignancies: clinical findings and management for intensive chemotherapy completion."
American Journal of Hematology Dec; 68 (4): 231-236
110. Nucci M., Biasoli I., Akiti T., Silveira F., Solza C., Barreiros G., Spector N., Derossi A., Pulcheri W. (2000):
"A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Itraconazole Capsules as Antifungal Prophylaxis for Neutropenic Patients."
Clinical Infectious Diseases; 30:300-305
111. Oren I., Haddad N., Finkelstein R., Rowe J.M. (2001):
"Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients during hospital construction: before and after chemoprophylaxis and institution of HEPA filters."
American Journal of Hematology Apr; 66 (4): 257-262
112. Pagano L., Antinori A., Ammassari A., Mele L., Nosari A., Melillo L., Martino B., Sanguinetti M., Equitani F., Nobile F., Carotenuto M., Morra E., Morace G., Leone G. (1999):
"Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies. Clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes"
European Journal of Haematology 63, 77-85
113. Panigrahi S., Nagler A., Or R., Wolf D.G., Slavin S., Shapira M.Y. (2001): **"Indolent aspergillus arthritis complicating fludarabine-based non-myeloablative stem cell transplantation."**
Bone Marrow Transplant Mar 27 (6): 659-661
114. Pfaller M. A., Jones R. N., Messer S. A., Edmond M. B., Wenzel R. P. (1998):
"National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of Candida other than Candida albicans: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program."
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 30:121-129

115. Pfaller M. A., Messer S. A., Hollis R. J., Jones R. N., Doern G. V., Brandt M. E., Hajjeh R. A. (1999):
„Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida* species in the United States.”
Mycology 33:217-222
116. Pfaller M.A. (1992):
"Epidemiological typing methods for mycoses."
Clinical Infectious Diseases 14, Suppl 1, 4 – 10
117. Pfaller M.A. (1996):
"Nosocomial Candidiasis: Emerging species, reservoirs, and modes of transmission."
Clinical infectious diseases 22 (Suppl 2), 89-94
118. Rask C.U., Peterslund N.A. (2000):
"Invasive aspergillosis in haematological patients."
Ugeskr Laeger Feb 7; 162 (6): 773-777
119. Reichenberger F., Habicht J., Kaim A., Dalquen P., Bernet F., Schläpfer R., Stulz P., Perruchoud A.P., Tichelli A., Gratwohl A., Tamm M. (1998):
"Lung Resection for Invasive Pulmonary Aspergillosis in Neutropenic Patients with Hematologic Diseases."
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine Volume 158, Number 3, September, 885 – 890
120. Reichenberger F., Habicht J., Matt P, Frei R., Soler M., Bolliger C.T., Dalquen P., Gratwohl A., Tamm M. (1999):
"Diagnostic yield of bronchoscopy in histologically proven invasive pulmonary aspergillosis"
Bone Marrow Transplant Dec; 24 (11): 1195-1199
121. Reiss E., Obayashi T., Orle K., Yoshida M., Zancope-Oliveira R.M. (2000):
"Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections."
Med Mycol; 38 Suppl 1: 147 – 159
122. Rex J. H., Pfaller M. A., Barry A. L., Nelson P. W., Webb C. D. (1995):
"Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomised multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of non-neutropenic patients with candidemia."
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39:40-44

123. Rex J. H., Rinaldi M. G., Pfaller M. A. (1995):
"Resistance of Candida species to fluconazole."
Antimicrobial Agents and Chemotherapy **39**:1-8
124. Rhodes J.C., Oliver B.G., Askew D.S., Amlung T.W. (2001):
"Identification of genes of aspergillus fumigaris up-regulated during growth on endothelial cells."
Med Mycol June; 39 (3): 253 – 260
125. Richardson M.D., Kokki M.H. (1998):
"Diagnosis and prevention of fungal infection in the immunocompromized patient."
Blood-Rev. 12 (4) : 241-254
126. Richardson M.D., Kokki M.H. (1999):
"New perspectives in the diagnosis of systemic fugal infections."
Ann Med Oct; 31 (5): 327 – 335
127. Salerno C.T., Ouyang D.W., Pederson T.S., Larson D.M., Shake J.P., Johnson E.M., Maddaus M.A. (1998):
"Surgical therapy for pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients."
Ann Thorac Surg May; 65 (5); 1145-1149
128. Sandhu G., Kline B., Stockman L., Roberts G. (1995):
"Molecular probes for diagnosis of fungalinfection."
Journal of Clinical Microbiology **33**:2913-2919
129. Schmidt D.
"Etablierung und Evaluierung eines gattungsspezifischen Oligonukleotides zum Nachweis von Candida-DNA bei neutropenischen Patienten"
Med. Dissertation, Universität Tübingen
130. Selig R.M., Starcher E.T., Curran, J.W. (1997):
"Oppurtunistic diseases reported in AIDS patients: frequencies, associations, and trends"
AIDS **1**, 175-182
131. Sevilla J., Hernandez-Maraver D., Aguado M.J., Ojeda E., Morado M., Hernandez-Navarro F. (2001):
"Autologous peripheral blood stem cell transplant in patients previously dieagnosed with invasive aspergillosis".
Ann Hematol Aug; 80 (8): 456-459

132. Skladny H., Buchheidt D., Baust C., Krieg-Schneider F., Seifarth W., Leib-Mösch C., Hehlmann R. (1999):
"Specific detection aspergillus species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR."
Journal of Clinical Microbiology 37 (12) 3865-3871
133. Slavin M.A., Osborne B., Adams R., Levenstein M.J., Schoch H.G., Feldman A.R., Meyers J.D., Bowden R.A. (1995):
"Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after marrow transplantation - a prospective, randomized, double-blind study"
Journal of Infectious Diseases, 171, 1545-1552
134. Spiess B., Buchheidt D., Baust C., Skladny H., Seifarth W., Zeilfelder U., Leib-Mosch C., Morz H, Hehlmann R. (2003):
"Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of aspergillus fumigatis DNA in clinical samples from neutropenic patients."
Journal of Clinical Microbiology May; 41 (5): 1811 – 1818
135. Spinillo A., Capuzzo E., Gulminetti R., Marone P., Colonna L., Piazzini G. (1997):
"Prevalence of and risk factors for fungal vaginitis caused by non-albicans species"
American Journal Obstetrics and Gynecology
136. Sulahian A., Boutboul F., Ribaud P., Leblanc T., Lacroix C., Derouin F. (2001):
"Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study."
Cancer Jan 15; 91 (2): 311-318
137. Szollosi J., Damjanovich S., Matyus L. (1998):
"Application of fluorescence energy transfer in the clinical laboratory: routine and research."
Cytometry 34,159-179
138. Turenne C.Y., Sanche S.E., Hoban D.J., Karlowsky J.A., Kabani A.M. (1999): **"Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system."**
Journal of Clinical Microbiology 37(6): 1846-1851

139. Turin L., Riva F., Galbiati G., Cainelli T. (2000):
"Fast simple and highly sensitiv double rounded PCR assays to detect medical relevantal fungi in dermatological specimens."
Eur J Clin Invest 30(6): 511-518
140. Van Burik J.A., Myerson D., Schreckhise R.W.,
 Bowden R.A. (1998):
"Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens."
Journal of Clinical Microbiology. 36, (5) : 1169-1175
141. Van Deventer A.J., Goessens W.H., van Belkum A.,
 van Vliet H.J., van Etten E.W., Verbrugh H.A. (1995):
"Improved detection of candida albicans by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis."
Journal of Clinical Microbiology 33(3):625-628
142. Verweij P.E., Latgé J.P., Rijs A.J., Melchers W.J.,
 De Pauw B.E., Hoogkamp-Korstanje J.A., Meis J.F. (1995):
"Comparison of antigen detection and PCR assasy using brochoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary Aspergillosis in patients receiving treatment for haematological malignancies."
Journal of Clinical Microbiology 33: 3150-3153
143. Viscoli C., Girmenia C., Marinus A. Collette L., Martino P.,
 Vandercam B., Doyen C., Lebeau B., Spence D., De Pauw B.,
 Meunier F. (1999):
"Candidemia in cancer patients: a prospective multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organisation for research and Treatment of Cancer (EORTC)
Clinical Infectios diseases 28, 1071-1075
144. von Eiff M., Roos N., Schulten R., Hesse M., Zühlsdorf M.,
 van de Loo J. (1995):
„Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival.”
Respiration 62: 341-347
145. Wahyuningsih R., Freisleben H.-J., Sonntag H.-G., Schnitzler P.
 (August 2000):
"Simple and Rapid Detection of Candida albicans DNA in Serum by PCR for Diagnosis of Invasive Candidiasis."
Journal of Clinical Microbiology Vol. 38, No. 8; S. 3016-3021

146. Wald, A., Leisenring W., van Burik J., Bowden R.A. (1997):
"Natural history of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation."
Clinical infectious diseases 175 : 1459-1466
147. Warnock D.W. (1995):
"Fungal complications of transplantation: Diagnosis, treatment and prevention."
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 36: 73-90
148. Weiss C., Kappe R., Sonntag H.-G. (1997):
„Western blot analysis of the immune response to *Candida albicans* antigens in 391 long term intensive care patients”.
Mycoses 40:153-157
149. White P.L., Shetty A., Barnes R.A. (2003):
"Detection of seven candida species using the LightCycler system."
Journal of Medical Microbiology 52:229-238
150. White T.C., Marr K.A., Bowden R.A. (1998):
"Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug Resistance."
Clinical Microbiology Reviews, 11,382-402
151. White T.C., Pfaller M.A., Rinaldi M.G., Smith J., Redding S.W. (1997):
"Stable azole drug resistance associated with a substrain of *Candida albicans* from an HIV-infected patient."
Oral diseases 3,102-109
152. Williams R.H., Ward E., H. McCartney A. (2001):
"Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores".
67 (6) 2453-2459
153. Wingard J.R. (1995):
“Importance of *Candida* Species Other than *C.albicans* as Pathgens in Oncology Patients”
Clinical infectious diseases 20, 115-125
154. Wingard J.R. (1997):
"Efficacy of amphotericin B lipid complex injection (ABLIC) in bone marrow transplant recipients with life-threatening systemic mycoses"
Bone marrow Transplant 19,343.

155. Worthy S.A., Flint J.D., Muller N.L. (1997):
**"Pulmonary complications after bone marrow transplantation:
high-resolution CT and pathologic findings."**
Radiographics Nov - Dec; 17 (6): 1359-1371
156. Yamakami Y., Hashimoto A., Tokimatsu I., Nasu M. (1996):
**"PCR detection of DNA specific for Aspergillus species in serum
of patients with invasive Aspergillosis."**
Journal of Clinical Microbiology 34 : 2464-2468
157. Yeo, S.F., Wong B. (2002):
**"Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive
fungal infections"**
Clinical Microbiology Reviews 15 (3) 456-484
158. Yoshida M. (2001):
"Monitoring and prophylaxis."
Nippon Ishinki Gakkai Zasshi 42 (4): 205 – 210
159. Yuriko Yamakami Y., Hashimoto A., Yamagata E.,
Kamberi P., Karashima R., Nagai H., Nasu M. (1998):
**"Evaluation of PCR for detection of DNA specific for aspergillus
spp. in sera of patients with various forms of pulmonary
asregillosis".**
Journal of Clinical Microbiology 36 (12) 3619-3623
160. Zhao J., Kong F., Li R., Wang X., Wan Z., Wang D. (2001):
**„Identification of aspergillus fumigatus and related species by
nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed
spacer regions.”**
Journal of Clinical Microbiology. 39 (6) : 2261-2266

Danksagung

Herrn Prof. Dr.med.H.Einsele:

Einen besonderen Dank für die Überslassung des Themas, die sehr wohlwollende Betreuung, die Geduld und die Freundlichkeit, welche sie dieser Arbeit entgegengebracht haben.

Herrn Dr.med.H.Hebart:

Vielen Dank für Ihr unermüdliches Engagement welches mir beim Erstellen dieser Arbeit sehr geholfen hat.

Herrn Dr.rer.nat.J.Löffler:

Jürgen, mein ganz besonderer Dank gebührt Dir. Du warst mit Deinen Antworten zu allen experimentellen und methodischen Fragen und deiner organisatorischen Unterstützung immer die überaus hilfreiche Brücke zwischen Theorie und Praxis.

Frau U. Schumacher:

Für die hilfreiche Unterstützung bei den mikrobiologischen Vorarbeiten und im Umgang mit mikrobiologischen Fragen.

Frau I. Kumbier:

Ingrid, Dir habe ich es zu verdanken, daß ich so schnell mit der Materie vertraut wurde und auch später standest Du mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank für all Deine großzügige Hilfe.

Dem „GvH-Labor-Team“

F.Frank, I.Wagner U.Grigolet, N.Henke, L.Hagmeyer, M.Hartmann, F.Serey, D.Schmidt, P.Wuchter, S. Magga, K.Klöpfer, S.Daginik, T.Ljubicic, C.Bollinger, D.Wolf, P.Cox, R.Bauer, Eszter und Sofia:

Euch einen großen Dank für die umfangreiche praktische Unterstützung, die vielen hilfsreichen Hinweise, die interessanten Gespräche und die unheimlich angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor einschließlic den Ausflügen und Stadtführungen.

An die Firma Roche geht ein großer Dank für die Bereitstellung des LightCyclers sowie die Zahlreichen Lieferungen der Testkits.

Meine Familie und Freunde:

Danke, daß Ihr mich bei diesem Vorhaben unterstützt habt,
Tobias, Reinhard und Papa, Ihr habt mit Eurer Fachkompetenz bezüglich Computern sehr viel zum äußeren Erscheinungsbild dieser Arbeit beigetragen..

Herr T. Hunecken:

Tobias, Dir gilt das größte Dankeschön, Du warst immer für mich da. Deine Unterstützung und Motivierung haben all dies in dieser Form ermöglicht.

Lebenslauf

Nicole Michaela Hunecken (geb. Flues) geb. am 20.03.1976 in Stuttgart

Schulbildung:

1982-1985	Oscar-Schwenk-Schule in Waldenbuch
1986-1993	Freie Waldorfschule auf den Fildern
1993-1995	Michael-Bauer-Schule in Vaihingen
1994	Mittlere Reife in Vaihingen
1995	Abitur in Vaihingen

Hochschulbildung:

04/1996-07/1997	Studium der Humanmedizin an der J.W.Goethe-Universität in Frankfurt am Main
10/1997-11/2002	Studium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
03/1998	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
03/1999	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Tübingen
03/2001	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Tübingen
2001-2002	Praktisches Jahr am Steinbergklinikum in Reutlingen
20.11.2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Tübingen