

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Optimierung
eines vollautomatisierten, PCR – basierten
Nachweisverfahrens von DNA aus humanpathogenen
Pilzen**

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard - Karls - Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Andreas Florian Fürchtegott Baumann

aus

Reutlingen

2004

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter
2. Berichterstatter

Professor Dr. H. Einsele
Frau Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	5
1.1 Pilzinfektionen	5
1.1.1 Morphologie der Pilze	5
1.2 Menschliche Abwehrmechanismen	6
1.3 Krankheitsbilder	7
1.4 Risikopatienten	10
1.5 Inzidenz	11
1.6 Diagnostik	12
1.6.1 Molekularbiologische Techniken	14
1.7 Therapiemöglichkeiten	15
1.8 Zielsetzung	17
2. Patienten, Material und Methoden	20
2.1 Pilzkulturen	20
2.1.1 Herstellung von Verdünnungsreihen	21
2.2 Kontaminationsmonitoring	21
2.3 Automatisierte DNA -Extraktion	21
2.3.1.1 Vorbehandlung der Blutproben	21
2.3.1.2 Extraktionsversuche ohne Vorbehandlung	22
2.3.1.3 Zellwanddisruption	23
2.3.1.4 Vorbehandlung von Gewebeproben	23
2.4.1 MagNA Pure LC TM	26
2.4.2 MagNA Pure LC TM Software	29
2.4.3 MagNA Pure LC TM Gerätevorbereitung	29
2.4.4 MagNA Pure LC TM Extraktionsprotokolle	30
2.4.5 Evaluierung eines neuen Extraktionskits	30
2.5 Detektions – und Amplifikationsprotokoll	31
2.6.1 Real – time PCR mit dem LightCycler TM	32

2.6.2	Die Sonden des LightCyclers™	34
2.6.3	LightCycler™ Ergebnis – Dokumentation	36
2.6.4	LightCycler™ Schmelzkurvenanalyse	36
2.7	Auftauversuche	36
2.8.1	PCR / PCR - ELISA	37
2.8.2	PCR – ELISA Inhibitions – bzw. Amplifikationsprotokolle	40
2.9	Gelelektrophorese	42
2.10.1	Patientenproben	43
2.10.2	Aspergillus Diagnosekriterien (EORTC)	44
2.11	Mäuseproben	46
2.12	Herkunftsbezeichnungen	46
3.	Ergebnisse	49
3.1	Patientenproben / MagNA Pure™ - LightCycler™	49
3.2	Evaluierung eines neuen Extraktionskits	57
3.3.1	Sensitivitätstestung Kit III	60
3.3.2.1	Reproduktions – und Kontaminationsversuche (I)	61
3.3.2.2	Reproduktions – und Kontaminationsversuche (II)	63
3.5	MagNA Pure™ – Extraktion ohne Vorbehandlung	64
3.6	FastPrep™ / Fast DNA® Kit	65
3.7	Auftauversuche	70
3.8	Inhibitions – bzw. Amplifikationskontrolle bei PCR - ELISA	73
4.	Diskussion	74
	Schlussfolgerung und zukünftige Anwendungen	80
5.	Literatur	82
	Anhang	87
	Abkürzungen	87
	Danksagung	90
	Lebenslauf	91

1. Einleitung

1.1 Pilzinfektionen

1.1.1. Morphologie der Pilze

Pilze sind eukaryontische Lebewesen mit einer ausgeprägten, meist aus Chitin (vgl. Insekten) und Hemicellulosen bestehenden Zellwand. Sie zeichnen sich, anders als beispielsweise Bakterien, durch das Vorhandensein eines echten Zellkerns aus, die DNA wird also von einer Membran umgeben. Den benötigten Energiebedarf decken die Pilze durch den Abbau organischer Substanzen, ein Vorgang der als Heterotrophie bezeichnet wird. In der Humanmedizin lassen sich vier Arten von Pilzinfektionen voneinander unterscheiden: Mykosen (parasitäre Erkrankungen), Mykoallergosen (allergische Erkrankungen), Mykotoxikosen (Vergiftungen durch Mykotoxine) und Myzetismus (Genuß giftiger Pilze). Bei den Wachstumsformen unterscheidet man zwei Arten, auf der einen Seite das Wachstum mit Pilzfäden (Hyphen), und auf der anderen das Wachstum durch Zellsprossung. Die Hyphen können sich verzweigen, wodurch ein Geflecht entsteht, das dann als Mycel bezeichnet wird. Deswegen nennt man diese Wachstumsform auch M – Form. Bei der Wachstumsform der Zellsprossung, wie sie bei den Hefepilzen (u.a. Candida - und Kryptokokkus - Arten) auftritt, entsteht eine Tochterzelle ausgehend von einer Öffnung der Zellwand. Diese Form wird Y - Form genannt. Bei einigen Candida - Arten kann man auch ein Längenwachstum der Tochterzellen feststellen, was dann als Pseudomycel bezeichnet wird. Pilze vermehren sich durch Sporen, wobei es sowohl geschlechtliche als auch ungeschlechtliche Vermehrungsformen gibt (Böcker et al., 1997).

1.2 Menschliche Abwehrmechanismen

Der gesunde menschliche Organismus ist vor den meisten Infektionen durch Pilze effektiv geschützt. Die Abwehrreaktion des Körpers erfolgt abhängig vom Erreger auf spezifischer oder unspezifischer zellulärer Ebene. Schimmelpilze und Sproßpilze der Gattung *Candida* werden hierbei von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen abgewehrt. Ein Fehlen dieser Zellen prädisponiert zu einer invasiven Pilzinfektion, einer invasiven Aspergillose, Candidamykose oder Zygomycose. Risikofaktoren sind vor allem Alkoholismus, Diabetes mellitus, Leukopenie und eine Kortisontherapie.

Aspergillosen entstehen exogen durch Inhalation des ubiquitär vorkommenden Erregers. Es handelt sich hierbei um Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus*, wobei *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* und *Aspergillus terreus* die häufigsten humanpathogenen Arten darstellen. Im Vordergrund stehen bei der Erkrankung der Befall der Lunge und der Nasennebenhöhlen. Bei immunsupprimierten Patienten besteht die Gefahr der Absiedelung in andere innere Organe mit einer Letalität von 45 % und mehr.

Candidamykosen entstehen meist endogen. Die Vertreter der Gattung *Candida* gehören zu den fakultativ pathogenen (opportunistischen) Erregern. Für einen Teil dieser Hefen stellt der menschliche Verdauungstrakt einen natürlichen Lebensraum dar. Nur unter bestimmten, die Immunität herabsetzenden Bedingungen, können diese Pilze pathogen wirken. Zu den wichtigsten Vertretern gehören *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* und *Candida inconspicua* (Böcker et al, 1997). Bei vulvovaginalen Candidosen beispielsweise ist *Candida albicans* mit 71,19 %, *Candida glabrata* mit 11,80 % und *Candida tropicalis* mit 7,87 % vertreten (Buitron Garcia et al, 2002).

Eine Übersicht über die prädisponierenden Faktoren gibt Tabelle 1.

Tabelle1: Prädisponierende Faktoren für Mykosen (Böcker et al, 1997)

<p>Krankheiten</p>	<p>Infektionskrankheiten Verbrennungen hormonelle Erkrankungen gastroenterologische Erkrankungen hämatologische Erkrankungen Immundefekte (z.B. AIDS) maligne Tumoren</p>
<p>Medikamente / therapeutische Eingriffe</p>	<p>Immunsuppression Kortikosteroid - Einsatz Zytostatika - Einsatz Bestrahlungstherapie Antibiotikatherapie Katheter chirurgische Eingriffe</p>
<p>andere Faktoren</p>	<p>physiologische Lebensabschnitte: Früh- und Neugeborene Schwangerschaft ernährungsphysiologische-, örtliche-, berufliche Faktoren</p>

1.3 Krankheitsbilder

Das Spektrum der Pilzinfektionen ist breit gefächert und reicht von einer Kolonisation der transienten Flora auf der Haut und der Schleimhäute des Respirations- und Gastrointestinaltraktes bis hin zur generalisierten systemischen Mykose. Es lassen sich je nach Lokalisation oberflächliche, subkutane und tiefe Mykosen unterscheiden. Oberflächliche Mykosen entstehen beim Befall der Haut, der Nägel und der Haare, sowie von

Schleimhautoberflächen. Bei den subkutanen Mykosen handelt es sich um Infektionen, die meist auf dem Boden von Verletzungen entstehen, wobei auch ein Übergreifen auf den Knochen nicht ausgeschlossen werden kann. Oftmals ist diese Form der Mykose durch eine chronische granulierende Entzündung gekennzeichnet und zumeist in den Tropen zu beobachten. Die tiefen oder inneren Mykosen können schließlich einzelne Organe befallen oder aber generalisiert auftreten. In Europa stehen hierbei opportunistische Erkrankungen beim Vorliegen prädisponierender Faktoren im Vordergrund. Bei den systemischen Mykosen handelt es sich meist in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit um Candidosen, Aspergillosen, Kryptokokkosen und Mukormykosen, seltener um Trichosporosen oder Fusarien - Infektionen. Alle generalisierten Organmykosen haben einen in der Mehrzahl der Fälle letalen Verlauf gemein. Bei den beobachteten Infektionen muß man zwischen Infektionen mit primärpathogenen Pilzen und fakultativ pathogenen Pilzgattungen unterscheiden. Primärpathogene Pilzgattungen wie Histoplasma, Coccidioides und Blastomyces führen auch beim immunkompetenten Organismus zu Infektionen, welche sich meist primär pulmonal manifestieren, jedoch auch systemische Mykosen verursachen können.

Der Befall der Schleimhäute ist meist Ausgangspunkt für innere Mykosen. Eine wichtige Rolle spielen hierbei Exoenzyme (Phospholipasen, saure Proteinase und Phosphomonoesterasen) sowie verschiedene Zellwandproteine (Manoproteine) als Adhäsine.

Die Erreger der Gattung Candida dringen über die Schleimhäute ein und verteilen sich anschließend über die Blutwege. Eine bestehende Grunderkrankung und die prädisponierenden Faktoren spielen bei der Manifestationsform eine entscheidende Rolle. So tritt eine oropharyngeale oder ösophageale Candida - Mykose vorzugsweise nach einer Antibiotikatherapie auf. Ferner spielt eine Erkrankung an Diabetes mellitus oder ein zugrundeliegender zellulärer Immundefekt eine Rolle.

Bei bestehender Neutropenie kann eine disseminierte Infektion akut oder chronisch auftreten, wobei sich im Akutfall ein septisches Krankheitsbild mit

Fungämie und multiplen viszeralen und kutanen Läsionen zeigt. Die chronifizierte Candidiasis ist durch hepatolienale Herdbefunde bei fehlender Fungämie gekennzeichnet (Walsh et al., 1996). Eine Manifestation der Mykose im ZNS, wobei zentrale Absiedelungen bei Empfängern von Knochenmark - Transplantaten in 50 % der Fälle von Aspergillus- und in 25% von Candida - Spezies verursacht werden (Denning, 1998), führt zu einer schlechten Prognose für den Patienten. Oftmals kommt es hierbei zur Ausbildung von Hirnabszessen, anämischen Infarzierungen und Hämorrhagien.

Mykosen die durch Aspergillus - Arten verursacht werden, manifestieren sich meist primär als akute beziehungsweise chronische Pneumonien, allergische bronchopulmonale Aspergillosen, oder in präformierten Kavernen als Aspergillome (Denning, 1998).

Nicht nur Aspergilluspezies, sondern auch seltenere Schimmelpilze wie *Paecilomyces variotii*, *Alternaria* sp. und Mucorales lassen sich in jüngerer Zeit als Erreger beobachten (Hebart et al., 1999).

Der Infektionsweg durch die ubiquitär vorkommenden Aspergillus - Erreger ist aerogen. Anschließend können die Pilze in die Blutbahn eindringen, sich so ausbreiten, und eine Fungämie beziehungsweise eine systemische Mykose auslösen. Ein Organbefall zeigt sich in etwa jedem vierten Fall, wobei Absiedlungen in der Leber, der Milz und im ZNS die Hauptrolle spielen. Ein Befall des zentralen Nervensystems nimmt in den meisten Fällen einen letalen Verlauf.

Neuere Beobachtungen zeigen, daß zunehmend Mykosen von bisher als nicht humanpathogen bezeichneten, beziehungsweise selten vorkommenden Pilzgattungen hervor gerufen werden (Hebart et al., 1999). Zu diesen Gattungen gehören unter anderem *Rhizopus*, *Fusarium*, *Trichosporum*, *Malassezia*, *Pseudoallescheria* und *Scedosporium*.

Die Tatsache, dass die Anzahl der durch bisher nur wenig erforschten Erreger verursachten Erkrankungen zunimmt, führt dazu, dass Pilzinfektionen die Medizin in Zukunft wahrscheinlich in größerem Ausmaß beschäftigen werden als sie es heute bereits tun. Diese Entwicklung verdeutlicht, dass sowohl bei der

Diagnostik - und hier insbesondere bei der Früherkennung - wie auch bei der Behandlung der Mykosen besondere Anforderungen bewältigt werden müssen. Der möglichst frühzeitigen Diagnose und Therapie der Aspergillose kommt höchste Bedeutung zu, da diese Erkrankung bei entsprechend abwehrgeschwächten Patienten auf Grund des schnellen Wachstums des Erregers und seiner bevorzugten Invasion in Blutgefäße rasch fortschreitet (Stevens et al., 2000).

1.4 Risikopatienten

In der Vergangenheit hat sich die Medizin meist nur mit Pilzkrankungen auf der Haut oder auf den Schleimhäuten beschäftigen müssen. Erst vor etwa 50 Jahren, als es zum Einsatz der Kortikosteroide kam, nahm die Häufigkeit der invasiven Mykosen mehr und mehr zu. Rankin beschrieb zum ersten mal eine Aspergillose bei einem Patienten mit Agranulozytose im Jahre 1953 (Rankin, 1953).

Heute gibt es für eine Reihe von Infektionskrankheiten adäquate Präparate zur Behandlung und viele bakterielle Erkrankungen haben ihren Schrecken verloren. Jedoch treten mehr und mehr andere Erreger in den Vordergrund und verursachen Infektionen, die sich nur sehr schwer behandeln lassen. Hierzu gehören neben Viren wie dem HI - oder dem Cytomegalievirus (CMV) in zunehmendem Maße auch Pilze (Williamson et al., 1999).

Besonders gefährdet sind Patientenkollektive mit einer immunkompromittierenden Therapie, wozu auch Patienten mit Knochenmark- und Stammzelltransplantationen gehören. Gerade bei diesen Patienten wächst die Anzahl der durch bisher als nicht pathogen angesehenen Pilze verursachten Infektionen in zunehmendem Maße (Groll et al., 1996). Neben den Patienten, bei denen durch eine Therapie die Immunkompetenz verloren gegangen ist, existieren noch weitere Patientenkollektive, die ebenfalls nicht über eine ausreichende spezifische oder unspezifische Immunantwort verfügen, wozu unter anderem Frühgeborene, HIV - Infizierte und Verbrennungsoffer gehören.

Die Behandlung der Pilzinfektionen mit Antimykotika birgt eine Reihe von Komplikationen, wobei mit an erster Stelle die hohe Nebenwirkungsrate bei

systemischem Einsatz zu nennen ist. Eine prophylaktische Antimykotikagabe ist zwar denkbar, aber nicht anzustreben, denn ebenso wie bei Bakterien lässt sich in jüngerer Zeit eine Resistenzentwicklung einzelner Pilzstämme anhand der Zunahme der von ihnen verursachten Krankheiten beobachten (De Marie, 2000).

1.5 Inzidenz

Die Inzidenz einer invasiven Aspergillose ist während den 1990er Jahren bei hämatologischen Stammzelltransplantat – Empfängern stark angestiegen (Marr et al., 2002)

Untersuchungen ergaben, dass in den letzten zehn Jahren die Inzidenz systemischer Mykosen bei Hochrisikopatienten nach Knochenmark-beziehungsweise Stammzelltransplantation auf bis zu 20 % angestiegen ist (Einsele et al, 2001).

Die häufigsten Erreger dieser Infektionen sind *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans*. Neben einer zunehmenden Zahl von non - *albicans* Candidaspezies handelt es sich in etwa 30 % der Fälle um invasive Infektionen mit *Aspergillus* - Arten und in ungefähr 7 % um *Candida* - Mykosen. Die Mortalität ist vor allem bei diesem Patientenkollektiv sehr hoch, denn auch mit adäquater Therapie versterben etwa 25 % der an einer Candidose Erkrankten und bis zu 99 % der Aspergillose - Patienten.

Invasive fungale Infektionen sind wichtige Ursachen für die Morbidität und Mortalität bei neutropenischen Patienten (Walsh et al, 1996).

Eine invasive Aspergillose stellt heute eine der Haupttodesursachen in Hämatonkologischen - und Organtransplantationszentren dar (Denning, 1998), ihre Inzidenz ist abhängig von der Grunderkrankung. Der prozentuale Anteil wird in Tabelle 2 veranschaulicht.

Tabelle 2: Aspergillose - Inzidenz, Abhängigkeit von der Grunderkrankung

Anteil	Grunderkrankung
5 - 25 %	Patienten mit akuter Leukämie
10 %	Empfänger einer allogenen Knochenmarktransplantation (KMT)
0,5 - 5 %	Empfänger einer autologen KMT, Patienten nach zytotoxischer Therapie bei hämatologischen Erkrankungen, Patienten nach Organtransplantationen (höchste Inzidenz nach Herz - Lungen - Transplanten)
1 - 12 %	AIDS - Patienten
25 - 40 %	Patienten mit chronischer Granulomatose

Zusätzlich zu den Grunderkrankungen spielen noch andere, individuelle Faktoren eine Rolle. So wirken sich vorangegangene Kolonisationen der Schleimhäute, anamnestische Pilzinfektionen, die Entwicklung einer „Graft –versus - host“ (GvH) – Erkrankung, sowie eine Behandlung mit Kortikosteroiden negativ auf die Prognose des Patienten aus.

Ein weiterer die Prognose beeinflussender Faktor ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung, wobei auch mit berücksichtigt werden muß, daß derzeit noch relativ wenige sensitive Testverfahren etabliert wurden. Diese Tatsache und die dadurch nicht entdeckten Infektionen könnten dazu führen, daß die zuvor genannten Inzidenzraten in Wirklichkeit weitaus höher liegen.

1.6 Diagnostik

Die Frühsymptomatik invasiver Mykosen ist nur schwer von einer bakteriellen oder viralen Erkrankung zu unterscheiden. Erst im Verlauf der Erkrankung, bei Auftreten der klassischen Symptome wie antibiotika - / virustatikaresistentem

Fieber, Dyspneu, eventuell Hämoptysen, Schmerzen beim Atmen und auskultatorisch pneumonieverdächtigen Befunden, kann die Diagnose erhärtet werden. Nach wie vor basiert die Diagnose meist auf mehreren Einzelbefunden, die unter Einbeziehung des individuellen Risikos und der klinischen Symptome des Patienten bewertet werden müssen (Denning, 2000). Die klinischen Symptome einer invasiven pulmonalen Aspergillose unterscheiden sich nicht von denen anderer fungaler Pneumonien, z.B. Candida – Pneumonie. Bei der physikalischen Krankenuntersuchung fehlen oft die Zeichen einer Pneumonie (von Eiff et al, 1995).

Es existiert keine diagnostische Methode, die universell anwendbar und allein sensitiv und spezifisch genug wäre (Denning, 1998).

Bildgebende Verfahren (Röntgen - Thorax, Lungen - CT, etc.) können bei der Diagnostik herangezogen werden, haben aber den großen Nachteil, dass sie erst spät diagnostisch aussagekräftig werden.

Aspergillus - Infektionen können kategorisiert werden anhand von spezifischen radiologischen Mustern, anhand des Immunstatus des Patienten und anhand der Präsenz oder der Abwesenheit von vorbestehenden strukturellen Lungenerkrankungen (Gotway et al., 2002).

Die mikroskopische Untersuchung mit speziellen Färbetechniken (KOH- oder Grocott – Gomori - Methenamin – Silber - Färbung) von Proben aus bronchoalveolären Lavagen (BAL), aus Sputum, Sinuslavagen und aus Biopsaten lässt zwar den Nachweis von Hyphen oder Sporen zu, aber eine genauere Differenzierung der Erreger ist nicht möglich. Eine Pilzinfektion lässt sich mit dem Nachweis von entsprechenden Strukturen in sterilen Probenmaterialien mit dieser Methoden zwar relativ schnell feststellen, jedoch ist dieses Verfahren für eine sichere Diagnosestellung nicht ausreichend spezifisch genug. Darüber hinaus ist auch die Gewinnung von Probenmaterialien wie BAL oder Biopsaten bei den betroffenen Patienten nicht immer möglich oder mit hohem Risiko verbunden. Auch das Anlegen von Blutkulturen ist nicht sehr effektiv, da sie zum einen bei Candida - Infektionen in etwa 50 - 70 % der Fälle zu falsch negativen Ergebnissen führen, und zum anderen verbleiben sie bei fast allen Patienten mit invasiven Aspergillosen negativ.

Galactomannan - Tests, im Handel zu erwerbende Antigenteste, sind ebenfalls nicht sensitiv genug (ihre Sensitivität liegt unter 70 %) und können darüber hinaus nicht quantitativ ausgewertet werden. PCR – Assays ermöglichen eine frühere Diagnose von invasiven pulmonalen Aspergillosen verglichen mit Galaktomannan – ELISA (Omagari et al., 1999).

Auch andere Antigenessays, wie beispielsweise zum Nachweis von Candidazellwandkomponenten in Kombination mit Blutkultur- und Antikörpernachweisen, haben mit einer Sensitivität von 80 % und einer Spezifität von 93 % eine nur eingeschränkte Aussagekraft.

So ist die Tatsache weniger verwunderlich, dass die meisten Fälle invasiver Mykosen, und hierbei meist invasive Aspergillosen, erst nach dem Tode des Patienten durch pathologische Untersuchungen (Gewebehistologie und Immunhistochemie) bestätigt werden (Bodey et al., 1992).

1.6.1 Molekularbiologische Techniken

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient heute vielen Nachweis- und Charakterisierungsmöglichkeiten von humanpathogenen Pilzen als Basis.

So ist die PCR beispielsweise eine sensitive Methode zur Detektion von Aspergillus – DNA aus bronchoalveolären Lavagen (Kawazu et al., 2003). Die Mehrheit der molekularen Testverfahren sind PCR – basierte Assays, die sich hauptsächlich auf die Detektion von Candida und Aspergillus Spezies aus klinischen Proben konzentrieren (Chen et al., 2002).

Für die Amplifizierung der fungalen DNA benötigt man hierbei spezielle Primer. Die hier beschriebenen Primer sind komplementär zu hochkonservierten Sequenzen der 18s rRNA Genregion und ermöglichen eine Amplifikation der meisten klinisch bedeutenden fungalen Pathogene (Einsele et al., 1997, Löffler, 1997). Die anschließende Zuordnung der Amplifikate zu den einzelnen Gattungs- oder Spezieszugehörigkeiten kann mit Hybridisierungsreaktionen mit spezifischen Oligonukleotiden, mit Blotting – Methoden, oder mit Hilfe von markierten Sonden erfolgen. In dieser Arbeit wird das LightCycler™ - Verfahren eingesetzt, eine von der Firma Roche (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) entwickelte quantitative Echtzeit - PCR - Methode. Hierbei binden

speziesspezifische und fluoreszenzmarkierte Oligonukleidsonden innerhalb der amplifizierten Gensequenz, und vereinigen die Amplifikation und die Detektion in einem Protokoll (Löffler et al., 2000).

Ein Hauptproblem besteht jedoch darin, an die zu amplifizierende Pilz - DNA überhaupt heran zu kommen, da die Nukleinsäuren von einer Zellwand geschützt werden. Die Bestandteile dieser Barriere, meist Chitin und Mannan, führen dazu, daß diese eine ausgeprägte Lyseresistenz besitzt. Verschiedene Arbeiten beschäftigen sich mit diesem Problem und es wurden Lysetechniken mit Zymolyase / Lytikase oder chemische und –physikalische Extraktionsmethoden mit unterschiedlichem Erfolg eingesetzt.

1.7 Therapiemöglichkeiten

Ziel muss es zunächst sein, ein Diagnoseverfahren zu entwickeln, das auch geringste Erregernachweise noch vor Auftreten klinischer Zeichen nachweisen kann. Ist die Pilzlast erst einmal zu hoch, ist die Progredienz der Infektion meist nicht aufzuhalten, und die Prognose für den Patienten sehr schlecht. Noch dazu wird an diese Nachweismethode die Bedingung der extremen Sensitivität und der schnellen Durchführbarkeit gestellt.

Derzeit stellt Amphotericin B, ein makrozyklisches Polyen - Antimykotikum den etablierten Standard in der Therapie invasiver Mykosen dar. Amphotericin B ist gegen ein breites Spektrum von Erregern fungaler Erkrankungen wirksam und schließt auch die Aspergillus - und Candida - Spezies mit ein, die für über 90 % der Infektionen hämatologisch erkrankter Patienten verantwortlich gemacht werden. Darüber hinaus werden Resistenzentwicklungen gegen das Medikament selten beobachtet. Von Nachteil sind allerdings die häufig beobachteten, meist schwerwiegenden Nebenwirkungen (vor allem die Nephrotoxizität). Außerdem spricht nur etwa die Hälfte der behandelten Patienten auf die Behandlung an (Denning, 1998, Latgé, 1999).

Um die auftretenden Nebenwirkungen abzuschwächen werden liposomale Zubereitungen anstelle des konventionellen Amphotericin B in der Therapie

eingesetzt. Die liposomale Aufbereitung erbringt den Vorteil, dass das Präparat eine gesteigerte Gewebegängigkeit besitzt (Hebart et al., 1999), und die Nephrotoxizität wird abgeschwächt.

Bei Patienten, die auf eine Amphotericin B - Behandlung nicht ansprechen („non-responder“), kann Itraconazol eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich um ein Triazol mit breitem antifugalem Wirkspektrum. Die Medikation setzt jedoch eine orale Aufnahmefähigkeit des Patienten voraus, da derzeit keine intravenöse Applikationsform zur Verfügung steht. Hinzu kommen noch zwei weitere Nachteile, denn zum einen ist der first-pass Mechanismus bei gleichzeitiger Gabe von Cytochrom p - 450 induzierenden Substanzen für eine ausreichend hohe Konzentration zu groß, und zum anderen wurden bereits resistente Aspergillus - Stämme beschrieben (Denning, 1998).

Bei Candida - Infektionen kann Fluconazol eingesetzt werden, Candida glabrata und Candida krusei sind jedoch intrinsisch resistent gegen diesen Wirkstoff. Auch bei Candida tropicalis wurden bereits Resistenzentwicklungen beobachtet. Einsatz findet dieses Medikament hauptsächlich zur Infektionsprophylaxe bei besonders gefährdeten Patienten.

Flucytosin wird aufgrund einer raschen Resistenzentwicklung fast nur in Kombination mit Amphotericin B eingesetzt, hat aber den Vorteil, daß es gut gewebeängig ist und somit bei Infektionen des ZNS verwendet werden kann. Der Wirkstoff wird in der Zelle zu Fluoruracil verarbeitet und stört dadurch die Proteinsynthese der Pilze.

Posaconazol und Voriconazol sind weitere Breitspektrum - Azole, die in der experimentellen Therapie invasiver Mykosen Erfolge versprechen (ICAAC 2001). Bei Patienten mit invasiver Aspergillose führte die primäre Therapie mit Voriconazol zu einem besseren Ansprechen und zu einem besseren Überleben als die primäre Behandlung mit Amphotericin B (Herbrecht et al, 2002). Auch zeigt Voriconazol in – vitro ein gutes Ansprechen auf Candida Spezies, Aspergillus supp. und Cryptococcus neoformans (Hoffmann et al, 2002).

Darüber hinaus sind Echino - und Pneumocandine (Caspofungin, Nikkomycin, Pradimicin und Sordaicin) weitere Präparate, die zukünftig vielleicht neue Therapieoptionen ermöglichen werden.

Eine nicht - medikamentöse Option stellt die Verkürzung der neutropenischen Phase bei immunsupprimierten Patienten dar. Es wird versucht, die Funktion der Granulozyten und Makrophagen mit Granulozytentransfusionen oder mit Gabe von Zytokinen wie IFNg, G-CSF und GM-CSF zu verbessern.

Die chirurgische Entfernung lokaler Befunde ist oftmals unumgänglich, vor allem dann, wenn das Risiko der Arrosion in große Blutgefäße besteht. In Fällen die eine fatale Blutung zur Folge hätten, wird auch dann chirurgisch eingegriffen, wenn der Zustand des Patienten dies nur eingeschränkt ermöglicht.

1.8 Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Optimierung eines vollautomatisierten, PCR - basierten Nachweisverfahrens von DNA aus humanpathogenen Pilzen.

Die Behandlung von Patienten mit invasiven Mykosen erfordert eine frühzeitig beginnende adäquate Therapie um bestmögliche Prognosen zu erhalten, was wiederum eine frühest mögliche Diagnosestellung voraus setzt.

Bisherige PCR - basierte Nachweisverfahren (konventionelle PCR, NASBA, etc.) helfen zwar schnelle Diagnosen zu stellen, jedoch beanspruchen diese Methoden einen meist hohen Zeiteinsatz. Vor allem die Teilbereiche Extraktion, Amplifikation und Detektion erfordern einen hohen Zeitaufwand.

Die Kombination von MagNA Pure TM und LightCycler TM , also die automatische Extraktion und die anschließende automatische Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren, erbringt eine wesentliche Zeitersparnis. Eine komplette

Untersuchung der Patientenproben ist mit diesem Verfahren innerhalb eines Arbeitstages problemlos durchführbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Sensitivität und Spezifität der Extraktion, das Kontaminationsrisiko bei der Extraktion, sowie andere, die Extraktionsvorbereitung betreffende Schritte zu untersuchen und dieses Kombinationsverfahren zu optimieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Untersuchung von Blutproben verschiedener Patienten. Sollten diese Patienten mit Aspergillus infiziert worden sein, so sollten fungale Nukleinsäuren in diesen Blutproben mit der Kombination von MagNA Pure™ und LightCycler™ nachweisbar sein.

Es sollten also aus Vollblutproben fungale DNA extrahiert, und anschließend amplifiziert und detektiert werden.

Parallel sollte eine konventionelle Extraktions – und Amplifikationsmethode durchgeführt werden, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Des Weiteren sollten Methoden zur Extraktionsvorbereitung, insbesondere zur Zellwanddisruption untersucht werden. Hierbei sollte sowohl die Notwendigkeit einer entsprechenden Vorbehandlung getestet werden, wie auch ein Vergleich eines neuen Gerätes zur Aufspaltung mit der herkömmlichen Methode mit Glaspartikeln stattfinden. Es sollte weiterhin geklärt werden, ob eine DNA - Extraktion aus Blutproben auch ohne eine vorherige Erythrozytenlyse möglich wäre.

Anschließend sollte der Frage nachgegangen werden, ob die extrahierte DNA bei den bisherigen Lagerungsbedingungen einen Schaden nimmt. Hierbei waren verschiedene Auftauversuche über einen längeren Zeitraum erforderlich.

Da das Erregerspektrum bei invasiven Mykosen ständig zunimmt, sollte ein neuer Extraktionskit (Kit III, Bacteria, Fungi) für die Extraktion von DNA verschiedener Pilze evaluiert, und mit dem bisher verwendeten verglichen werden. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit der Extraktionsergebnisse, sowie auf die

Kontaminationsgefahr gelegt. Auch sollte ein Vergleich zwischen der automatisierten und einer manuellen DNA - Extraktionsmethode stattfinden.

Da es immer wieder vorkommen kann, dass verschiedene Inhibitoren, beispielsweise Albumin im Blut, bei der DNA – Extraktion nicht ausreichend eliminiert werden können, sollte als letztes Ziel eine Inhibitions – bzw. Amplifikationskontrolle für die PCR – ELISA Methode etabliert werden. Gleichzeitig wurde nach einem internen Standard gesucht, bei welchem eine Amplifikation von fungaler DNA ohne Sensitivitätsverlust möglich wäre.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Pilzkulturen

Kulturen der folgenden Pilzstämmen wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Tübingen bezogen, siehe Tabelle 3:

Tabelle 3: Liste der benutzten Pilze

<u>Schimmelpilze</u>	<u>DSM</u>	<u>Hefepilze</u>	<u>DSM</u>
Aspergillus fumigatus	790	Candida albicans	1665
Aspergillus niger	737	Candida glabrata	70614
Aspergillus versicolor	1943	Candida krusei	70065
Aspergillus terreus	826	Candida dublinensis	nicht bek.
Alternaria alternata	1102	Candida lusitaniae	70102
Absidia corymbifera	1144	Candida inconspicua	70631
Acremonium chrysogenum	880	Candida peliculosa	70130
Penicillium brevicompactum	3825	Rhodotorula pilimanae	70825
Penicillium chrysogenum	844	Trichosporum capitatum	70698
Rhizopus oryzae	905		
Scopulariopsis brevicaulis	1218		
Sporidiobolus salmonicolor	70847		
Paecilomyces variotii	1961		
Aspergillus flavus	818		

Aspergillus nidulans	820		
----------------------	-----	--	--

2.1.1. Herstellung von Verdünnungsreihen

Ausgehend von den Stammsuspensionen wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Pilze hergestellt. Hierbei wurde sterile 0,9 % NaCl – Lösung beziehungsweise sterilfiltriertes Wasser (H₂O) benutzt, um Verdünnungsschritte von 10e6 – 10e0 Zellen pro ml zu erhalten.

Teilweise wurden Blutproben von gesunden Probanden mit diesen Verdünnungen versetzt, um somit Blutproben mit bekannten Erregerzahlen zu erhalten. Dadurch konnten Proben von infizierten Patienten imitiert werden.

2.2 Kontaminationsmonitoring

Um eine eventuell auftretende Kontamination nachweisen zu können, wurde bei allen DNA - bzw. RNA - Extraktionsversuchen eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese bestand entweder aus sterilfiltriertem Injektionswasser, steriler 0,9 % NaCl - Lösung oder dem Erythrozytenlysispuffer (RCLB).

2.3 Automatisierte DNA - Extraktion

2.3.1.1 Vorbehandlung der Blutproben

Initial wurden EDTA - antikoagulierte Blutproben mit dem Erythrozytenlysispuffer RCLB (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) behandelt. Es bedarf zunächst einer Lyse der Erythrozyten, da Hämoglobin eine spätere PCR inhibieren, und somit eine Amplifikation der gewonnenen DNA behindern würde. Hierzu wurden jeweils 1000 ml der Blutproben mit 40 ml des RCLBs aufgefüllt, und anschließend 10 min bei Raumtemperatur auf einer Horizontalwippe inkubiert.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Red Cell Lysis Buffer (RCLB)

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Konzentration</u>
Tris-Puffer, pH 7,6	10 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
Natriumchlorid	5 mM

Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei etwa 1500 g für 10 min. Danach wurde dekantiert, das verbliebene Pellet resuspendiert, und diese Schritte wiederholt, um eine Erythrozytenlyse zu komplettieren. Hierbei konnte ein Pellet von etwa 300 – 400 µl gewonnen werden.

2.3.1.2 Extraktionsversuche ohne Vorbehandlung

In diesen Versuchen wurde versucht herauszufinden, inwiefern eine Vorbehandlung von Pilz – und Blutproben, notwendig ist.

Es kamen unbehandelte Aspergillus – Verdünnungsreihen zum Einsatz, wie auch verschiedene unbehandelte Blutproben.

Hierbei wurden Blutplasma - , Blutserum - und WBC (white blood cells) - Proben, unbehandelt in den MagNA Pure™ Extraktionsautomaten eingesetzt.

Jeweils 200 µl der Blutproben eines gesunden Probanden wurden zuvor mit je einer Aspergillus fumigatus Verdünnungsreihe der Konzentrationen 10e5 – 10e0 versetzt, um künstlich eine Fungämie mit bekannten Erregerzahlen simulieren zu können (Versuchsordnung siehe Tabelle 5). Die anschließende Extraktion

erfolgte mit dem MagNA Pure LC™ Automaten, die Amplifikation und Detektion mit dem LightCycler™.

Tabelle 5: Versuchsanordnung, Kapitel 2.3.1.2

Blutplasma	+ Aspergillus fumigatus 10e5 - 10e0
Blutserum	+ Aspergillus fumigatus 10e5 - 10e0
WBC	+ Aspergillus fumigatus 10e5 - 10e0

2.3.1.3 Zellwanddisruption

Um an die zu extrahierende DNA heran zu kommen, bedarf es einer Zellwanddisruption. Dies wurde durch eine mechanische Methode, bei der dem entstanden Pellet etwa 0,5 cm³ Glaskügelchen (Glass Beads) mit einem Durchmesser von 710 – 1,180 Microns zugeführt wurden, erreicht. Nach Zugabe der Glass Beads wurden die Probenröhrchen intensiv gevortext (pro Probe 1 Minute). Nach Absaugen der Flüssigkeit von den Glaskügelchen konnte ein maximales Probenvolumen von 200µl in das MagNA Pure LC™ „sample cartridge“ überführt werden.

2.3.1.4 Vorbehandlung der Gewebeproben

Auch Gewebeproben müssen für eine Extraktion mit dem MagNA Pure LC™ Automaten vorbereitet werden. Zunächst wurde versucht, die Gewebe mechanisch mit einem Skalpell zu zerkleinern, und die entstehenden Stücke mit WCLB (white cell lysis buffer) zu inkubieren, um die Gewebestruktur aufzulösen. Diese Methode erfordert zum einen einen relativ hohen Zeitaufwand, da die Gewebestücke mindestens vier Stunden mit dem WCLB inkubiert werden müssen, und zum anderen ist die Zerkleinerung aufwendig.

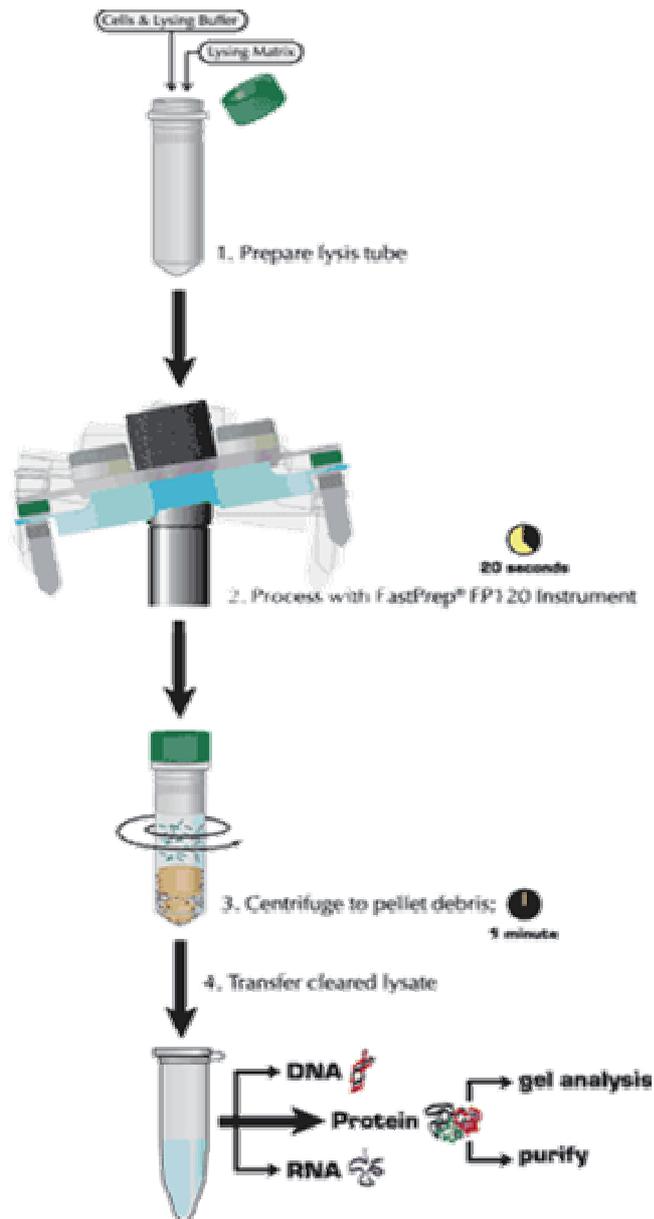
Die zweite Möglichkeit der Gewebezerkleinerung lieferte das FastPrep™ FP 120 Instrument.

Das FastPrep™ System soll Zellen lysieren und gleichzeitig die Nukleinsäuren bei minimalem shearing so schonend wie möglich behandeln. Darüber hinaus sollen Zellen lysiert werden können, welche sonst nur mit großem Aufwand (Enzyme, Homogenisierungsschritte, etc.) aufgespalten werden könnten. Weitere Vorteile wie die einfachere Handhabung, geringere Kontaminationsmöglichkeiten und ein Zeitersparnis, sollten ebenfalls durch Anwendung dieser Methode gewonnen werden.

Bei der Vorbehandlung mit diesem Gerät wurden die Gewebestücke initial mit 1 ml CLS-Y Puffer (Cell Lysis / DNA Solubilizing Solution for Yeast, Algae, and Fungi) versetzt. Dieser Ansatz wurde anschließend in spezielle Tubes mit Keramikkügelchen (1/4“ Ceramic Spheres) gefüllt, in das Gerät eingesetzt, und je nach Geräteeinstellung behandelt. Am Gerät ließen sich die Bearbeitungsstärke und die Zeitdauer einstellen. Benutzt wurden die Einstellungen 4,5 / 15 sec., 4,5 / 45 sec und 6,5 / 45 sec..

Das Fast Prep™ Instrument schüttelt anschließend die Proben bei sehr hoher Geschwindigkeit auf und ab (Arbeitsschema siehe Abb. 1), wobei die Zellwände aufgespalten, und die Nukleinsäuren möglichst schonend behandelt werden.

Abbildung 1: FastPrep™ Methode, Arbeitsschema



Anschließend wurden die Proben bei 13.000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, und das Lysat zur Weiterverarbeitung, beispielsweise zur Extraktion mit dem MagNA Pure LC™ Apparat, abpipettiert.

2.4.1 MagNA Pure LC™

Der MagNA Pure LC™ Automat der Firma Roche® (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) (siehe Abbildung 3) stellt einen vollautomatischen Extraktionsautomaten dar, der in der Lage ist, aus Patientenproben wie Blut, Serum, Plasma, bronchoalveolären Lavagen (BAL) und Liquor Nukleinsäuren (DNA, RNA und mRNA) zu gewinnen. Auch die Gewinnung von Nukleinsäuren aus Biopsaten ist nach entsprechender Vorbehandlung (spezielle externe Lyseschritte) möglich. Da der MagNa Pure LC™ als geschlossenes System arbeitet und manuelle Schritte während des Arbeitsprozesses nicht stattfinden, ist das Risiko der Kontamination des zu untersuchenden Materials auf ein Minimum beschränkt worden.

Mit diesem Apparat ist es möglich, bis zu 32 Proben innerhalb kürzester Zeit (in weniger als 60 min) zu verarbeiten und daraus qualitativ hochwertige Nukleinsäuren zu gewinnen.

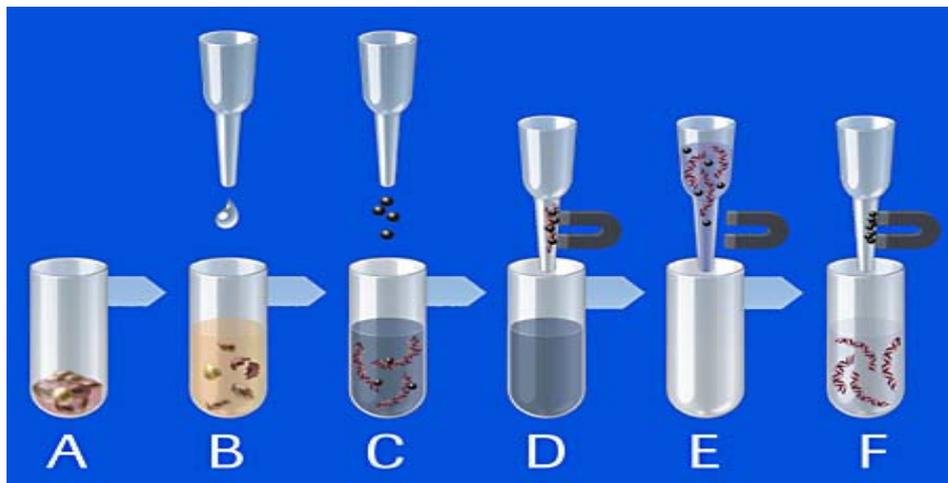
Dabei bedient man sich der Eigenschaft der Nukleinsäuren, sich bei hohen Salzkonzentrationen und Ionenstärken an Glas zu binden. Verstärkt wird diese Bindung durch eine poröse Oberfläche des Glases. Hierzu verwendet man magnetische Silicapartikel. Mit einem Eisenkern, auf den Magnetit aufkristallisiert ist, und einer Außenschicht aus Glasschuppen, die mit einem Sinterungsverfahren aufgebracht wurden, können diese Silicapartikel bei der Extraktion eingesetzt werden. Den Eisenkern benötigt man für die magnetische Isolation der an die Partikel bindenden Nukleinsäuren. Eine Übersicht über das Extraktionsprinzip gibt Abbildung 2 wieder.

Vor der eigentlichen DNA Extraktion mit dem MagNA Pure LC™ erfolgt eine Lyse der Zellen beziehungsweise der Gewebestücke. Dies wird erreicht, indem hohe Konzentrationen von Guanidiniumsalzen und Proteinase K den Proben hinzu

gegeben werden, um die Zellwände aufbrechen zu können. Danach sind die Nukleinsäuren frei zugänglich und können an die magnetischen Glaspartikel binden. Anschließend durchlaufen die gebundenen Nukleinsäuren zusammen mit den Glaspartikeln mittels eines im Pipettierarm befindlichen Magneten eine Reihe von Waschvorgängen mit unterschiedlichen Waschlösungen. So werden noch anhaftende Verunreinigungen nach und nach gewaschen. Nach der Reinigung müssen sich die Nukleinsäuren wieder von den Glaspartikeln lösen. Hierzu wird die Lösung bei hoher Temperatur in ein Medium mit niedriger Ionenstärke überführt. Die nun ungebundenen Partikel können wiederum mit dem Magneten aus der Lösung entfernt werden. Man erhält eine Lösung aus gereinigten Nukleinsäuren.

Durch diesen Vorgang ist es gelungen, einen Automaten zur Nukleinsäureextraktion zu konstruieren, der ohne Zentrifugationsschritte bzw. ohne Einsatz von Über- bzw. Unterdruck arbeiten, und somit kostengünstig und mit geringer Fehleranfälligkeit eingesetzt werden kann.

Abbildung 2: MagNA Pure LC™ - Extraktionsprinzip



- A: Proben überführen in sample cartiges
- B: Zugabe von Lysis Buffer und Zugabe von Proteinase K

- C: Zugabe von magnetic Glass
Particles
- D: Magnetic Separation
- E: Waschen und
Magnetic Separation
- F: Elution
(gereinigte DNA)

Abbildung 3: MagNA Pure LC™ Apparat (www.roche.com)



Der MagNA Pure LC™ Apparat (Roche Diagnostics, Penzberg) ist ein Nukleinsäureextraktionsautomat, der nach Einsatz der notwendigen

Plastikeinsätze und entsprechender Softwareprogrammierung als vollständig geschlossenes System arbeitet. Ein Öffnen des Gerätes oder eine manuelle Beeinflussung des Gerätes ist während des Extraktionsvorganges ohne Abbruch nicht möglich. Erst nach Beendigung aller Arbeitsschritte ist ein Eingreifen wieder möglich. Hierdurch wird das Risiko der Kontamination der zu extrahierenden Proben auf ein Minimum reduziert.

Im Anschluss an die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgt deren Amplifikation und Detektion. In der vorliegenden Arbeit kamen dazu zwei Methoden zur Anwendung, eine konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR) (siehe 2.8.1), und eine erst kürzlich etablierte Echtzeit - PCR (real - time PCR) mit dem LightCycler TM Automaten (siehe 2.6.1).

2.4.2 MAGNA Pure LC TM Software

Der MagNA Pure LC TM Automat wurde von Hersteller mit unterschiedlichen Software - Protokollen ausgeliefert. Diese beinhalten unterschiedliche automatisierte Extraktionen von DNA, RNA, mRNA oder allen in den eingesetzten Proben enthaltenen Nukleinsäuren. Nach Anwahl des entsprechenden Programms müssen lediglich noch die Anzahl und die Volumina der einzelnen Proben sowie deren Codierung eingegeben werden. Danach sind alle weiteren Arbeitsschritte des Gerätes festgelegt.

2.4.3 MagNA Pure LC TM Gerätevorbereitung

Die zu extrahierenden Proben wurden nach der Vorbehandlung in die sample cartridges überführt, und in die entsprechende Position im MagNA Pure TM Automaten eingesetzt. Darüber hinaus wurden die entsprechenden Puffer und die benötigten sterilen Einmal - Plastikartikel (Reagenziencontainer, Pipettenspitzen und processing cartridges) in die keimfreie Arbeitsfläche eingesetzt. Auskünfte über genaue Inhaltsangaben zu den einzelnen Reagenzien waren vom Hersteller leider nicht zu bekommen

2.4.4 MagNA Pure LC™ Extraktionsprotokolle

Für die Extraktionsvorgänge der hier beschriebenen Arbeiten kamen zwei Extraktionskits mit entsprechenden Programmen zur Anwendung. Dies war zum einen der total - NA Kit (MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit) und zum anderen der Kit III (MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III). Diese Protokolle wurden mit dem Ziel entwickelt, auch geringe Mengen von Nukleinsäuren (DNA und RNA) aus Proben extrahieren zu können, in denen nur geringe Zellkonzentrationen erwartet werden.

2.4.5 Evaluierung eines neuen Extraktionskits

Dieser Arbeitsschritt beinhaltete die Evaluierung eines neuen Extraktionskits für die Nukleinsäure - Extraktion mit dem MagNA Pure LC™, dem MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi). Hierzu wurden Verdünnungsreihen von 22 verschiedenen Pilzen (siehe Tabelle 6) herangezogen. Die Nukleinsäuren dieser Pilze wurden mit dem MagNA Pure LC™ Automaten und dem neuen Kit III extrahiert, und anschließend gelelektrophoretisch detektiert. Als Extraktionsvergleich diente die Extraktion mit dem bisher verwendeten Total NA Kit. Gleichzeitig wurde die Notwendigkeit der Zelldisruption durch Glaspartikel untersucht.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Pilze, Kapitel 2.4.5

1.Absidia corymbifera	9.Candida dublinensis	17.Penicillium chrysogenum
2.Acremonium chrysogenum	10.Candida glabrata	18.Scopulariopsis brevicaulis
3.Alternaria alternata	11.Candida inconspicua	19.Spiridiobolus salmonicolor
4.Aspergillus fumigatus	12.Candida krusei	20.Trichosporum capitatum
5.Aspergillus niger	13.Candida lusitaniae	21.Rhizopus oryzae
6.Aspergillus terreus	14.Candida peliculosa	22.Rhodotorula pilimanae

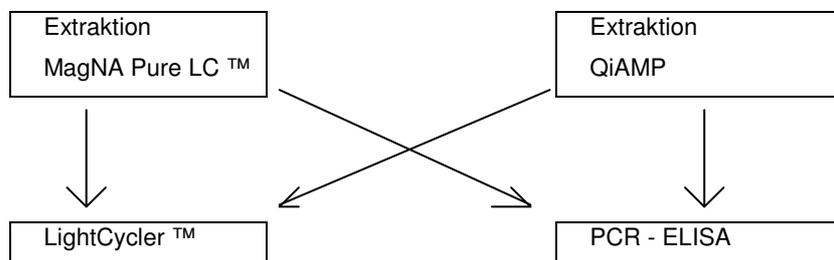
7. Aspergillus versicolor	15. Paecilomyces variotii	
8. Candida albicans	16. Penicillium brevicompactum	

2.5 Detektions- und Amplifikationsprotokolle

Nachdem die Nukleinsäuren eluiert worden waren, wurden sie in elution cartridges des MagNA Pure LC™ Automaten aufbewahrt. Da sie hierbei gekühlt wurden, konnten sie in diesen Zustand eine zeitlang bis zur Weiterverarbeitung verbleiben.

Um einen aussagekräftigen Vergleich mit einer bereits etablierten Extraktions- und Amplifikationsmethode zu erhalten, wurde ein Teil der Extraktionsvorgänge parallel mit der manuellen Methode (Lyticase und QiAMP Tissue Kit) extrahiert (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Vergleichsschema der Extraktions- und Amplifikationsmethoden



Die Amplifikation und Detektion der extrahierten Nukleinsäuren wurde entweder in einem konventionellen Thermoblock und anschließendem PCR - ELISA Verfahren oder mit der real - time Methode des LightCyclers™ durchgeführt. Somit konnten die Sensitivität und die Spezifität der beiden Nachweisverfahren miteinander verglichen werden.

2.6.1. Real-time PCR mit LightCycler™

Die isolierte DNA wird dem Extraktionsautomaten entnommen und unter sterilen Bedingungen in gekühlte Reaktionsgefäße (LightCycler™ - Glaskapillaren) überführt. Hinzu pipettiert man den sogenannten MasterMix (siehe Tabelle 7), der die für die Amplifikation benötigten Reagenzien enthält.

Abbildung 5: LightCycler™ (www.roche.com)



Die Glaskapillaren werden verschlossen und in das Probenkarussell des LightCycler™ Automaten eingesetzt. Um Luftblasen zu beseitigen und um den Reaktionsansatz in den unteren Teil der Kapillaren zu bringen, wird das Probenkarussell anschließend bei ca. 110 g zentrifugiert. Das Karussell wird

anschließend in den LightCycler™ eingesetzt und das Amplifikationsprogramm gestartet.

Tabelle 7: PCR-Reaktionsmix (MasterMix) für die LightCycler™ PCR

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Volumen [µl]</u>	<u>Gesamtkonzentration</u>
H ₂ O, steril	3,1	
MgCl ₂ (25 mM)	2,4	3 mM
LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation Probes	2,0	1x
forward Primer (24 µM)	0,25	0,6 mM
reverse Primer (24µM)	0,25	0,6 mM
Fluoreszein Sonde (FL) (30µM)	1,0	3 mM
LC-Red-640 Sonde (LC) (30µM)	1,0	3 mM
DNA	10,0	
<u>Gesamtvolumen</u>	20,0	

Tabelle 8: Temperaturprofil der LightCycler™ PCR

<u>Prozess</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
Initiale Denaturierung	9 min	95 °C
Amplifikation	Denaturierung	1 sec
	Annealing	15 sec
	Elongation	25 sec
<u>Zyklen: 45</u>		
	<u>Gesamtdauer:</u>	45 min

2.6.2 Die Sonden des LightCyclers™

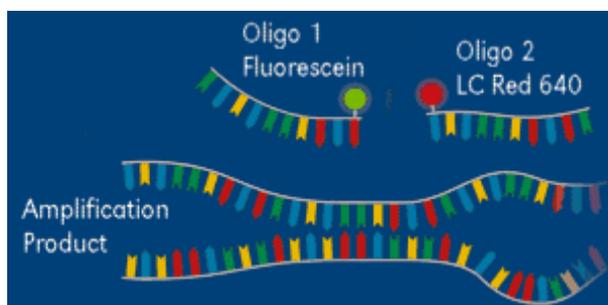
Die Amplifikationsmethode mit dem LightCycler Automaten erbringt den Vorteil, daß über die Software die Detektion und Amplifikation in Echtzeit (real - time PCR) verfolgt, und anschließend die amplifizierte Menge quantitativ bestimmt werden kann.

Hierzu benutzt man den Fluoreszenz – Resonanz – Energie - Transfer (FRET). Man benötigt zwei mit Fluoreszenzfarbstoffen versehene, sequenzspezifische Sonden, wobei die eine am 3` - Ende mit Fluoreszein markiert ist, die andere am 5` - Ende mit Red 640 (siehe Abbildung 6). Das Funktionsprinzip des LightCyclers™ gibt Abbildung 7 wieder.

Abbildung 6: LightCycler™ Sonden

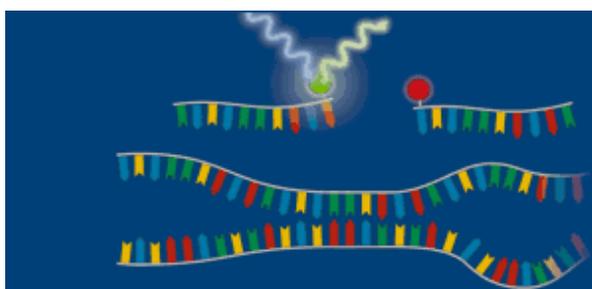
<u>Aspergillus supp.</u>
3` - FL: 5` - gTTCCCCCACA gCCA gTgAAggC - Fluoreszein - 3`
5` - LC: 5` - Red 640 - TgAggTTCCCCAgAAggAAAggTCCAgC - 3`

Abbildung 7: LightCycler™ Prinzip



Denaturierung, Sonden: 5` - Ende mit Red 640

3` - Ende mit Fluoreszein



Annealing: Sonden binden im Abstand von genau einer Base an den DNA – Strang
→ Lichtemission und Detektion



Elongation, Sonden werden wieder verdrängt und liegen wieder frei vor

Sobald die beiden Sonden während des Amplifikationsprozesses in der Annealing Phase an die Targetsequenz binden, befinden sie sich auf dem DNA - Einzelstrang im Abstand von genau einer Base voneinander. Diese Position ist wichtig, da nur in diesem Abstand der Energietransfer stattfinden kann. Nach Anregung durch eine im Gerät befindliche blaue Lichtquelle sendet nun die am 3`- Ende mit Fluoreszein markierte Sonde ein grünes Licht mit einer Wellenlänge von 640 nm aus. Dadurch wird nun die 5`- Red 640 markierte Sonde angeregt und sendet Licht mit einer Wellenlänge von 640 nm aus. Am Ende der Annealing Phase kann dieses Licht im Kanal 2 des optischen Gerätes des LightCycler TM Apparates gemessen werden.

An die Annealing Phase schließt sich die Elongation an. Bei diesem Vorgang werden die Sonden vom Einzelstrang wieder verdrängt, wodurch kein Licht mehr ausgesendet wird, und folglich kein Signal mehr gemessen werden kann. Bei der an die Elongation anschließende Denaturierung findet keine Hybridisierung der Sonden mit dem DNA - Strang statt, somit kann bei diesem Vorgang auch kein Signal aufgezeichnet werden.

2.6.3. LightCycler™ Ergebnis - Dokumentation

Die Ergebniswerte sind Angaben der jeweiligen crossing – points.

Als crossing – point wird der Zyklus bezeichnet, bei dem die im LightCycler™ gemessene Fluoreszenz linear ansteigt.

Um so geringer der Wert eines crossing – points ausfällt, um so mehr Nukleinsäure konnte durch den LightCycler™ detektiert werden.

2.6.4 LightCycler™ Schmelzkurvenanalyse

Die beim Amplifikationsprozeß eingesetzten Primer sind universell, können also viele Pilzspezies amplifizieren. Um feststellen zu können ob eines oder mehrere Amplifikationsprodukte im Reaktionsansatz entstanden sind, führt man am Ende eines jeden LightCycler™ - Laufes eine Schmelzkurvenanalyse durch. Das Prinzip liegt hier darin begründet, dass die Sonden auch teilweise mit Amplifikaten hybridisieren, welche jedoch nicht in allen Basen komplementär sind, und nach Erhöhung der Temperatur bereits bei niedrigeren Temperaturen wieder abschmelzen. Die Temperatur wird bei der Schmelzkurvenanalyse stetig von 50 °C auf 95 °C mit einer Geschwindigkeit von 0,2 °C / sec. erhöht, und somit die vorliegende doppelsträngige DNA denaturiert. Es entstehen hierbei wieder Fluoreszenzsignale, dadurch verursacht, dass erneut eine Hybridisierung der Sonden mit den Einzelsträngen stattfindet. Die Software kann diese Signale kontinuierlich messen, und die entstehenden unterschiedlichen Schmelzkurven können zur Analyse herangezogen werden.

2.7 Auftauversuche

Wird die DNA nach dem Extraktionsprozeß nicht unmittelbar weiter verarbeitet, so wird sie in Eppendorf Tubes bei - 20 °C eingefroren und gelagert.

Um herauszufinden, ob dieser Lagerungsprozess ungünstige Auswirkungen auf die spätere Amplifikation und Detektion der Nukleinsäuren hat, wurden verschiedene *Aspergillus fumigatus* Verdünnungsreihen (10e5 - 10e1) mit dem MagNA Pure LC™ extrahiert, anschließend eingefroren, und nach

unterschiedlichen Zeitabständen wieder aufgetaut um sie mittels LightCycler™ zu detektieren und zu amplifizieren. Gleichzeitig wurde versucht herauszufinden, ob die bisher benutzten Lagerungsbehälter einen negativen Qualitätseinfluss auf die DNA ausüben. Hierzu wurden die extrahierten Nukleinsäuren parallel in konventionelle Eppendorf Tubes und in im Inneren mit Silikon beschichtete Röhrchen überführt.

Insgesamt wurden 8 Auftauversuche über einen Zeitraum von 4 Monaten vorgenommen. Zum jeweiligen Versuchszeitpunkt wurde die gesamte DNA - Menge aufgetaut, so dass die am Ende verbliebene Menge insgesamt 8 mal den Einfrierungs - und Auftauprozess durchlaufen hatte.

2.8.1 PCR / PCR - ELISA

Eine bereits etablierte konventionelle PCR (Löffler, 1997) diente als Vergleich der Extraktionsmethoden mit dem MagNA Pure™ Automaten oder mit Qiagen. Bei dieser PCR benutzt man die selben Primer wie bei der LightCycler™ - PCR (siehe Tabelle 7). Um eine anschließende Detektion mittels PCR - ELISA zu ermöglichen, wird das Amplifikat mit Digoxigenindesoxyuraciltriphosphat markiert. Diese markierten Amplifikate werden anschließend durch Oligonucleotidsonden nachgewiesen. Eine Übersicht über den Ablauf der PCR, den eingesetzten PCR - Mix und den verwendeten Puffer geben die Tabellen 9 – 11. Nach abgeschlossener PCR erfolgt die Denaturierung der DNA. Hierzu wurde zu 20 µl Amplifikat die gleiche Menge an Denaturierungslösung zugegeben und vermischt. Anschließend kann die Hybridisierung stattfinden, indem dem Ansatz aus DNA und Denaturierungslösung 200 µl Hybridisierungslösung zugegeben wird. Diese Hybridisierungslösung enthält biotinylierte Oligonucleotide in einer Konzentration von 7,5 pM / ml. Aus dem Gesamtvolumen des Ansatzes werden nun 200 µl entnommen und in eine am Boden mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte überführt. Diese Platte wird dann bei 37 °C für 2,5 Stunden inkubiert. Gleichzeitig wird eine mit digoxinmarkierte DNA als Kontrollreaktion mitgeführt. Diese Kontroll - DNA, in Verdünnungen von 1 : 1, 1:10 und 1:100 vorgelegt, kann mit einer spezifischen und biotinmarkierten Kontrollsonde nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Inkubationsdauer erfolgen drei

Waschungen der Mikrotiterplatte mit einer Waschlösung. Danach wird den Proben 200 µl Anti-Digoxigenin-Antikörperlösung (Fab-Fragmente konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, 2,5 mU / ml) zugegeben, worauf sich eine Inkubation für 30 min bei 37 °C anschließt. Anschließend erfolgt eine sechsmalige Waschung mit der Waschlösung und jeder Probe wird nun 200 µl 2,2 Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-Lösung zugegeben. Wieder erfolgt eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Schließlich kann die Farbintensität in einem ELISA - Reader gemessen werden (Wellenlänge 405 nm, Referenzfilter 492 nm).

Tabelle 9: Temperaturprofil PCR

<u>Prozess</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
Initialdenaturierung	4 min	94 °C
Amplifikation		
Denaturierung	30 sec	94 °C
Annealing	60 sec	62 °C
Elongation	120 sec	72 °C
terminale Extension	5 min	72 °C
<u>Zyklen</u> : 34		
<u>Gesamtdauer</u> : ca. 3 Stunden		

Tabelle 10: PCR Mix

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Volumen</u>
10-fach Puffer	27,2
H ₂ O, steril	5
MgCl ₂ (25 mM)	2
Desoxyadenosintriphosphat (200 µM)	1
Desoxyguanosintriphosphat (200 µM)	1
Desoxycytidintriphosphat	1

(200 μ M)	
Desoxythymidintriphosphat (190 μ M)	1
Digoxigenindesoxyuracyltriphosphat (10 μ M)	1
Forward Primer (24 μ M)	0,25
Reverse Primer (24 μ M)	0,25
Taq Polymerase	0,3
DNA	10
<u>Gesamtvolumen</u>	50

Tabelle 11: 10-fach PCR-Puffer

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Konzentration</u>
Tris, pH 8,3	10 mM
Kaliumchlorid	50 mM
Magnesiunchlorid	1 mM

2.8.2 PCR - ELISA

Inhibitons – bzw. Amplifikationskontrolle

Dieser Versuch diente dazu, eine Minimalkonzentration eines internen Standards herauszufinden, bei welcher eine Amplifikation von Pilz – DNA ohne Sensitivitätsverlust möglich wäre.

Hierzu wurde ein artifiziell hergestellter Standard eingesetzt. An beiden Enden dieser artifiziellen Standard – Sequenz befinden sich Pilz – Genom – Sequenzen mit einer Länge von jeweils 20 Basenpaaren (bp), die komplementär zu den in der PCR verwendeten Pilzen sind. In der Mitte befindet sich eine Sequenz aus dem Genom des Cytomegalievirus (CMV) mit einer Länge von 57 Basenpaaren. Ziel war es, mit den bisher verwendeten Pilzprimern eine effiziente Inhibitionskontrolle zur Hand zu haben.

Inhibitoren, wie beispielsweise Albumin, können im Blut auftreten, die während der DNA – Extraktion nicht effektiv eliminiert wurden. Des weiteren müssen Pipettierfehler während des Ansetzens des PCR – Mixes oder ein Ausfall des PCR – Gerätes ausgeschlossen werden .

Zunächst wurde eine *Aspergillus fumigatus* Verdünnungsreihe, 10^4 – 10^1 , mit dem artifiziellen Standard versetzt, und anschließend mit der PCR – ELISA – Methode amplifiziert und detektiert. Jeweils 10 μ l *Aspergillus* – DNA der jeweiligen Verdünnungskonzentrationen wurden mit 2 μ l der Standard – DNA versetzt, wobei der Standard in Konzentrationen von 100 ng / μ l – 0,01 fg / μ l eingesetzt wurde. Zu den resultierenden 12 μ l wurden 28 μ l des PCR – Mastermix (Tabelle 10) hinzu gegeben und anschließend in das PCR Gerät eingesetzt.

Den Versuchsaufbau gibt Tabelle 12 wieder.

Tabelle 12: Versuchsaufbau I, Kapitel 2.8.2

(1) 10e4 Aspergillus DNA + 0,1 ng/μl Standard DNA	(2) 10e3 Asp. DNA + 0,1 ng/μl Standard DNA	(3) 10e2 Asp. DNA + 0,1 ng/μl Standard DNA	(4) 10e1 Asp. DNA + 0,1 ng/μl Standard DNA
(5) 10e4 Asp. DNA + 0,1 fg/μl Standard DNA	(6) 10e3 Asp. DNA + 0,1 fg/μl Standard DNA	(7) 10e2 Asp. DNA + 0,1 fg/μl Standard DNA	(8) 10e1 Asp. DNA + 0,1 fg/μl Standard DNA
(9) 10e4 Asp. DNA + 0,01 fg/μl Standard DNA	(10) 10e3 Asp. DNA + 0,01 fg/μl Standard DNA	(11) 10e2 Asp. DNA + 0,01 fg/μl Standard DNA	(12) 10e1 Asp. DNA + 0,01 fg/μl Standard DNA
(13) Negativ- Kontrolle			

Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Einfluss von humaner DNA auf die Amplifikation der Standard - DNA getestet. Hierzu wurden zu jeweils 10 μl humaner DNA 2 μl Aspergillus – DNA und 2 μl der Standard - DNA hinzu gegeben. Der Versuchsaufbau ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Versuchsaufbau II, Kapitel 2.8.2

(1) human DNA + 10e4 Asp. DNA + 0,1 ng/µl Standard DNA	(2) human DNA + 10e3 Asp. DNA + 0,1 ng/µl Standard DNA	(3) human DNA + 10e2 Asp. DNA + 0,1 ng/µl Standard DNA	(4) human DNA + 10e1 Asp. DNA + 0,1 ng/µl Standard DNA
(5) human DNA + 10e4 Asp. DNA + 0,1 fg/µl Standard DNA	(6) human DNA + 10e3 Asp. DNA + 0,1 fg/µl Standard DNA	(7) human DNA + 10e2 Asp. DNA + 0,1 fg/µl Standard DNA	(8) human DNA + 10e1 Asp. DNA + 0,1 fg/µl Standard DNA
(9) human DNA + 10e4 Asp. DNA + 0,01 fg/µl Standard DNA	(10) human DNA + 10e3 Asp. DNA + 0,01 fg/µl Standard DNA	(11) human DNA + 10e2 Asp. DNA + 0,01 fg/µl Standard DNA	(12) human DNA + 10e1 Asp. DNA + 0,01 fg/µl Standard DNA
(13) Negativ- Kontrolle			

2.9 Gelelektrophorese

Legt man an ein Agarosegel eine Spannung an, so können die aufgetragenen Amplifikationsprodukte aufgetrennt und unspezifisch nachgewiesen werden. Als Spannung dient ein Gleichstrom von 70 - 100 V und 85 - 125 mA, der für 90 - 120 min angelegt wird. Zunächst werden 10 µl des Amplifikationsproduktes mit 2,5 µl 5 x Laufpuffer (siehe Tabelle 14) versetzt und das Probenvolumen von nunmehr 12,5 µl in die Taschen eines auspolymerisierten, zweiprozentigen Agarosegels überführt. Das Agarosegel wird zuvor mit 100 ml 1x TAE-Puffer (siehe Tabelle 15) und 2 g Agarose hergestellt. Noch im flüssigen Zustand wird dem Gel 5 µl Gelstar zugefügt. Dieses Gelstar besitzt DNA - interkalierende Eigenschaften, und lässt sich durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz anregen. Am Ende des Prozesses wird das Gel unter UV - Licht mit 320 nm fotografiert und kann ausgewertet werden.

Tabelle 14: Zusammensetzung 5 x Laufpuffer

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Konzentration</u>
Tris, pH 7,6	50 mM
EDTA	50 mM
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,5 %
Bromphenolblau	0,1 %

Tabelle 15: Zusammensetzung 1 x TAE-Puffer

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Konzentration</u>
Essigsäure	0,1 M
Tris, pH 7,5	2 M
EDTA	2 M

2.10.1 Patientenproben

Insgesamt wurden 152 Blutproben von 38 Patienten untersucht. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von November 2001 bis Juli 2002. Es wurden minimal 1, maximal 22 Proben von einem Patienten getestet.

131 Proben wurden mit dem MagNA Pure™ Total NA Kit und 22 Proben mit dem Kit III untersucht. Es wurden EDTA - antikoagulierte Blutproben verwendet. Die Menge betrug etwa 1000 µl pro Probe. Die Patienten befanden sich in einer prospektiven, randomisierten klinischen Studie (Phase 3), welche Patienten nach allogener Knochenmark - oder Blutstammzelltransplantation einschloss. Die Studie verglich eine empirische Therapie invasiver Pilzinfektionen mit der PCR - basierten Initiation antimykotischer Therapie. Da die Etablierung der Extraktion von fungaler DNA aus Vollblut mit dem MagNA Pure LC™ bereits erfolgt war, wurde darüber hinaus noch die Reproduzierbarkeit, die Spezifität und die Sensitivität dieser Methode getestet.

2.10.2 Aspergillose Diagnosekriterien (EORTC)

Die folgenden Diagnosekriterien wurden von der European Organisation for Research on Treatment of Cancer (EORTC) erarbeitet.

Gesicherte invasive Aspergillose („proven“)

Die histologische bzw. zytologische Untersuchung einer steril gewonnenen Gewebeprobe (Nadelaspirat oder offene Biopsie) zeigt den für Aspergillen typischen Winkel von 45 ° verzweigten Hyphae zusammen mit einer Gewebealteration

oder

aus einer normalerweise sterilen Gewebe – und / oder Flüssigkeitsprobe, die von einem klinisch und radiologisch – sichtbar krankhaft verändertem Areal steril gewonnen wurde, lässt sich Aspergillus kultivieren.

Wahrscheinlich invasive Aspergillose („probable“)

Mindestens 1 Patientenkriterium (siehe Tabelle 16 a)

und

1 mikrobiologisches Kriterium (siehe Tabelle 16 b)

und

1 Major – oder 2 Minorkriterien aus der Gruppe der klinischen Kriterien (siehe Tabelle 16 c).

Tabelle 16a: Patientenkriterien

Neutropenie < 500 / µl für mehr als 10 Tage
Perisitierendes Fieber > 38 °C trotz Breitbandantibiotika für mehr als 96 Stunden
Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C zusammen mit prädisponierenden Faktoren wie prolongierte Neutropenie (> 10 Tage) in den letzten 60 Tagen, immunsuppressive Therapie in den letzten 30 Tagen, invasive Pilzinfektion in der Anamnese oder bestehenden HIV – Infektion
Symptome einer Graft – versus – Host – Disease
Behandlung mit Kortikosteroiden für mehr als 3 Wochen

Tabelle 16b: Mikrobiologische Kriterien

Positive Kultur von Aspergillus aus Sputum und / oder BAL
Positive Kultur oder Mikroskopie aus Sinus – Aspirat
Positiver Nachweis von Aspergillus – Antigen in BAL, Liquor oder > 2 Blutproben
Pathologische Lungenveränderungen ohne kulturellen Nachweis von bakteriellen Erregern Blut, Sputum, BAL

Tabelle 16c: Klinischen Kriterien

Major – Kriterien: Neu aufgetretene Lungeninfiltrate mit typischer Konfiguration in der Computertomographie („halo – sign“, „air – crescent - sign“ oder kavernöse – Läsion in einem Konsolidierungsareal), radiologische Zeichen einer invasiven und / oder destruierenden Sinusitis, radiologische Zeichen einer ZNS – Infektion
Minor – Kriterien: Klinische Symptome einer Infektion der unteren Atemwege (Husten, Brustschmerz, Atemnot, Hämoptysis), Pleurareiben im Auskultationsbefund, neu aufgetretene pulmonale Infiltrate, die die Major – Kriterien nicht erfüllen, klinische Symptome einer Sinusitis, Ulzerationen der Nasenschleimhaut, periorbitale Schwellung, nekrotische Herde am Gaumen und / oder Perforation des Gaumens, fokale neurologische Symptome, Meningismus, Bewusstseinsveränderungen oder abnormer Liquorbefund ohne Nachweis bakterieller bzw. viraler Erreger oder maligner Zellen
Klinische Kriterien einer hämatogenen Pilzinfektion: papuläre oder noduläre Hautveränderungen ohne andere Erklärung, Zeichen der Chorioretinitis oder Endophthalmitis mit für eine disseminierte Pilzinfektion typischem Erscheinungsbild

Mögliche invasive Aspergillose („possible“)

Mindestens 1 Patientenkriterium (Tabelle 16 a)

und

1 mikrobiologisches Kriterium (Tabelle 16 b) oder 1 Major – bzw. 2 Minorkriterien aus der Gruppe der klinischen Kriterien (Tabelle 16 c).

2.11 Mäuseproben

Es wurden mehreren Mäusen die inneren Organe (Herz, Lunge, Niere, Milz und Leber) entnommen. Die Mäuse dienten primär anderen Versuchszwecken, wurden aber nach der für diese Versuche notwendigen Tötung und Entnahme der Gebärmutter freundlicherweise von der Einrichtung für Tierschutz und Labortierkunde in Tübingen zur Verfügung gestellt.

Die Organe wurden dazu benutzt, verschiedene Extraktionsvorbehandlungen zu untersuchen. Insbesondere wurde hierbei die FastPrep™ - Vorbehandlung, die automatische Aufspaltung von Zellwänden (siehe 2.3.1.4), genauer unter die Lupe genommen.

2.12 Herkunftsbezeichnungen

Tabelle 17: Verbrauchsgegenstände

<u>Bezeichnung</u>		<u>Hersteller</u>
Reaktionsgefäße	MagNA Pure LC™ LigthCycler™ Capillaries PCR Gefäße FastPrep™ Gefäße	Roche Diagnostics, Mannheim Roche Diagnostics, Mannheim Biozym, Hessisch Oldendorf BIO 101
ELISA - Kits		Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler™ Kits	Hybridisation Probes	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure™ Kits	Total Nucleic Acid Isolation Kit (3038505) Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) (3264785)	Roche Diagnostics, Mannheim Roche Diagnostics, Mannheim
Glass Beads	710-1,180 microns	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Tabelle 18: Geräte

<u>Gerätename</u>		<u>Hersteller</u>
MagNA Pure LC™		Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler™ Instrument		Roche Diagnostics, Mannheim
FastPrep™ Instrument	FP 120	BIO 101
Sterilbänke	Hera Safe Biogard LaminAirHBB 2448	Heraeus, Hanau Baker Company, Stanford, USA Heraeus, Hanau
ELISA Reader	Rainbow	SLT, Crailsheim
ELISA Rüttler	MR	SLT, Crailsheim
Horizontalwippe	WS 5	Bühler, Tübingen
PCR - Prozessor	GeneAmp 2400	Perkin Elmer, Foster City, USA
Vortex	Vortex Mixer Genie 2	NeoLab® Bender & Hobein, Rottenburg
Zentrifugen	Rotixa IKS LC Carousell Centrifuge Multifuge 3s Biofuge 13	Hettich, Tübingen Roche Diagnostics, Mannheim Heraeus, Mannheim Heraeus, Fellbach
Wasserbad	GFL 1986 WB 7	Bender & Hobein, Rottenburg Memmert
Photometer	LS 500 BioPhotometer	Dr. Lange, Berlin Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Variopetten	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 19: Chemikalien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Red Cell Lysis Buffer (RCLB)	Roche Diagnostics, Mannheim
RCLB	Universitätsapotheke Tübingen
White Cell Lysis Buffer (WCLB)	Puffer: Universitätsapotheke Tübingen Protinase: Roche Diagnostics, Mannheim

Tabelle 20: Enzyme, Nukleotide, Primer, Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Lyticase	<u>Bezeichnung</u>
Primer	Roth, Karlsruhe
LightCycler Sonden	TibMolBiol, Berlin
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pr5omega, Madison, USA

3. Ergebnisse

3.1 Patientenproben / MagNA Pure™ - LightCycler™

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit 152 Blutproben von insgesamt 38 Patienten auf eine invasive Aspergillose hin untersucht, wobei von einem einzelnen Patienten zwischen 1 und 22 Proben untersucht wurden. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von November 2001 bis einschließlich Juni 2002 (vergleiche 2.10.8).

Die Untersuchung dieser Proben beinhaltete die Extraktion mit dem MagNA Pure LC™ Instrument, und die anschließende Amplifikation und Detektion der gewonnenen DNA mit dem LightCycler™. 131 Proben wurden hierbei mit dem Total Nucleic Acid Isolation Kit und 22 Proben mit dem DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) extrahiert.

Parallel wurden die Nukleinsäuren mit Qiagen extrahiert, mit PCR - ELISA amplifiziert und detektiert, und die Ergebnisse miteinander verglichen. Um bessere Vergleiche durchführen zu können, wurden auch die mit MAgNA Pure™ extrahierten Nukleinsäuren mit PCR - ELISA amplifiziert und detektiert.

24 Proben von 11 Patienten wurden mit Qiagen und PCR – ELISA Aspergillus -positiv getestet, 13 Proben von 5 Patienten wurden im Untersuchungszeitraum Aspergillus - positiv mit der Kombination von MagNA Pure™ und PCR – ELISA getestet. Lediglich 3 Proben konnten mit der Kombination von MAgNA Pure™ und LightCycler™ positiv auf Aspergillus getestet werden.

Eine Übersicht über die gewonnenen Ergebnisse zeigt Tabelle 21.

Tabelle 21: Extraktions- und Amplifikationsergebnisse, Kapitel 3.1, Patientenproben

positiv = positiv auf Aspergillus getestet / negativ = kein Aspergillusnachweis

<u>Extraktionsmethode</u>	<u>Amplifikationsmethode</u>	<u>positiv</u> <u>insgesamt</u>	<u>negativ</u> <u>insgesamt</u>
Qiagen	PCR ELISA	24	
MagNa Pure TM	PCR ELISA	13	11
MagNA Pure TM	LightCycler TM	3	21

Diese doch relativ große Differenz erforderte eine nähere Betrachtung der klinischen Verläufe der betroffenen Patienten. Hierbei wurde auf einen anhand von klinischen Symptomen geäußerten Verdacht und auf eine eventuelle Bestätigung einer invasiven Aspergillose geachtet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 a und Tabelle 22 b aufgeführt.

Tabelle 22a: Übersicht I

V.a. IA = Verdacht auf invasive Aspergillose / IA = invasive Aspergillose

<u>Patient</u>	<u>Datum</u> <u>Aspergillus</u> <u>positiv</u> <u>Qiagen /</u> <u>PCR - ELISA</u>	<u>Datum</u> <u>Aspergillus</u> <u>positiv</u> <u>MagNA</u> <u>Pure™/</u> <u>LightCycler</u> <u>™</u>	<u>Aspergillose</u> <u>klinisch</u> <u>möglich</u>	<u>Aspergillose</u> <u>invasive</u> <u>Aspergillose</u> <u>dokumentiert</u>
G. C. männlich * 1956	08.11./ 12.11./ 03.12.	12.11.	-	(keine Daten)
B.K., männlich * 1956	12.11./ 15.11./ 19.11.	-	V.a. IA 27.09.	ja (→ Tabelle 22b)
B.J., weiblich *1959	12.11./ 19.11./ 10.12./ 17.12.	12.11.	V.a. IA 01.10.	ja (→ Tabelle 22b)
T.H., weiblich *1974	13.11.	-	(→ Tabelle 22b)	nein
R.K., männlich *1960	19.11./03.12./ 17.12./ 20.12./23.01./ 05.02.	-	V.a. IA 15.11. (→ Tabelle 22b)	nein
S.T., männlich * (?)	15.11.	-	-	(keine Daten)
C.H., weiblich * 1946	19.11.	-	-	(keine Daten)
M.T., männlich * 1983	29.11./ 13.12.	13.12.	-	(keine Daten)
I.S., weiblich * 1956	03.12./06.12./ 17.12.	-	-	ja (→ Tabelle 22b)
S.T., männlich * 1960	03.12.	-	(→ Tabelle 22b)	nein
N.M., weiblich * (?)	13.12.	-	-	(keine Daten)

Tabelle 22b: Übersicht II

MIBIO: Mikrobiologische Untersuchung

<p>B. K., männlich * 1956 Tod 2001</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. gesicherte Aspergillose ab 18.10.01 2. MIBIO in Untersuchungszeitraum negativ 3. PCR Aspergillus positiv am 18.10./29.10./02.11./12.11./15.11./19.11.01 4. Diagnose: AML M1 (sekundäres MDS), ED 1/2000 5. Fremdallogene KMT 10/2001 6. unkontrollierte virale Infektionen 7. Entwicklung einer Haut - GvH 8. Therapie: Amphotericin B am 18.10.01 9. Therapie mit Caspofungin 10. Patient verstarb 11/2001 während des Untersuchungszeitraums an einer viralen Infektion
<p>B.J., weiblich * 1959</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. gesicherte Aspergillose 2. PCR Aspergillus positiv am 12.11./15.11./10.12./17.12.01 3. Diagnose: niedrig malignes Non – Hodgkin – Lymphom im Sinne einer B – CLL 4. Familiär - allogene Stammzelltransplantation 10/2001 5. Komplikationen: persistierendes Fieber unter Antibiose, Ansprechen auf Steroide, erneute Fieberentwicklung (Tag + 20) 6. CMV Reaktivierung 7. Studienteilnahme: Ambisome - Studie
<p>T. H., weiblich * 1974</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. kein gesicherter Aspergilloseenachweis 2. MIBIO negativ 3. PCR Aspergillus positiv am 20.09./04.10./13.11.01 4. PCR Candida negativ am 20.09./30.10./13.11. 5. Diagnose: CML, ED 07/2001 6. Familiär - allogene Blutstammzelltransplantation 09/2001 7. Komplikationen: CRP – Anstieg, Haut – GvH (Grad II), Darm – GvH (Grad 0), Allgemeingrad I, Gesamtgrad II 8. Studienteilnahme: liposomales Amphotericin B nach Stammzelltransplantation

<p>R. K., männlich * 1960</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. kein gesicherter Aspergillosernachweis 2. MIBIO negativ 3. PCR Aspergillus positiv am 29.11./13.12.01/23.01./05.02.02 4. Diagnose: Myeloproliferatives Syndrom vom Typ der megakaryozytären Myelose, ED 1983
<p>I. S., weiblich * 1956 Tod 2002</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. gesicherte Aspergillose ab 05.12.01 2. MIBIO Aspergillus durchgehend negativ 3. MIBIO Candida positiv am 18.12./20.12. 4. PCR Aspergillus positiv 15.11./03.12./17.12./20.12.01 5. PCR Candida positiv 15.11./03.12.01 6. Diagnose: Rezidiv einer C – ALL 8/2001 7. Familiär - allogene Blutstammzelltransplantation 11/2001 8. Komplikationen: CMV – Reaktivierung, kurzfristige Hämolyse, GvHD, therapierefraktäre ausgeprägte GvH des Darmes und der Leber 9. Tod 02/2002 10. Studienteilnahme: Ambisome - Studie
<p>S. T., männlich * 1960 Tod 2001</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. kein gesicherter Aspergillosernachweis 2. MIBIO negativ 3. PCR Aspergillus positiv 03.12.01 4. PCR Candida positiv 03.12./19.12./17.12./20.12.01 5. Diagnose: CML, ED 07/1997 6. Fremdallogene KMT 11/2001 7. Komplikationen: Fieber in der Aplasie, GvHD Grad IV, atypische Pneumonie mit Tod in der respiratorischen Insuffizienz 8. Studienteilnahme: Tecelac zur GvHD – Prophylaxe

Insgesamt standen von 5 Patienten keine Daten mehr zur Verfügung.

Von 11 Patienten waren insgesamt 24 Proben Aspergillus - positiv mit Qiagen – PCR – ELISA (siehe Tabelle 23 a).

Tabelle 23a: Aspergillus - positiv getestete Patienten, Qiagen - PCR - ELISA

fettgedruckt: gesicherte Aspergillose

Patient	Aspergillus - positiv (Datum)
G.C., männlich, *1956	08.11. / 12.11. / 03.12.01
B.K., männlich, * 1956	12.11. (Datum der ersten Positivtestung!) / 15.11. / 19.11.01
B.J., weiblich, * 1959	12.11. (Datum der ersten Positivtestung!) / 19.11. / 10.12. / 17.12.01
T.H., weiblich, * 1974	13.11.01
R.K., männlich, * 1960	19.11. / 03.12. / 17.12. / 20.12.01 / 23.01.02
S.T., männlich, * (?)	15.11.01
C.H., weiblich, * 1946	19.11.01
M.T., männlich, * 1983	29.11. / 13.12.01
I.S., weiblich, * 1956	03.12. (Datum der ersten Positivtestung!) / 06.12. / 17.12.01
S.T., männlich, * 1960	03.12.01
N.M, weiblich, * (?)	13.12.01

Von diesen 24 Proben waren 13 Proben von 5 Patienten auch MagNA Pure™ – PCR – ELISA Aspergillus - positiv (siehe Tabelle 23 b).

Tabelle 23b: Aspergillus - positiv getestete Patienten, MagNA Pure™(Total NA Kit) - PCR - ELISA

fettgedruckt: gesicherte Aspergillose

Patient	Aspergillus positiv (Datum)
G.C., männlich, * 1956	12.11. / 10.12.01
B.K., männlich, * 1956	12.11. (Datum der ersten Positivtestung!) / 19.11.01 <hr/> am 15.11. keine MagNA Pure™– PCR – ELISA Testung!
B.J., weiblich, * 1959	12.11. (Datum der ersten Positivtestung!) / 19.11. / 10.12.01 <hr/> am 17.12. keine MagNA Pure™ – PCR – ELISA Testung!
R.K., männlich, * 1960	19.11. (Datum der ersten Positivtestung!) / 03.12. / 17.12.01 / 07.01.02
I.S., weiblich, * 1956	03.12. (Datum der ersten Positivtestung!) / 17.12.01 <hr/> am 06.12. keine MagNA Pure™– PCR – ELISA Testung!

Von diesen 5 Patienten hatten 3 eine gesicherte Aspergillose. Bei einem Patienten konnte eine Aspergillose nicht gesichert werden, von einem Patienten standen keine Daten mehr zur Verfügung.

Alle 3 Patienten, die bewiesen an einer invasiven Aspergillose erkrankt waren, konnten also mit der Kombination von MagNA Pure™ und PCR - ELISA Aspergillus - positiv getestet werden. Das Datum der ersten Positivtestung war jeweils gleich.

Von den 24 Proben waren 3 Proben von 3 Patienten positiv mit MagNA Pure™ – LightCycler™ getestet worden, 1 Patient hiervon hatte eine gesicherte invasive Aspergillose.

Von den beiden anderen Patienten standen keine Daten mehr zur Verfügung (siehe Tabelle 23 c).

Tabelle 23c: Aspergillus - positiv getestete Patienten, MagNA Pure™ (Total NA Kit) - LightCycler™

fettgedruckt: gesicherte Aspergillose

Patient	Aspergillus - positiv (Datum)
G.C., männlich, * 1956	12.11.01
B.J., weiblich, * 1959	12.11.01 (Datum der ersten Positivtestung!)
M.T., männlich, * 1983	13.12.01

1 Patient hiervon war sowohl Qiagen – PCR – ELISA als auch MagNA Pure™ – PCR – ELISA positiv.

Die beiden Patienten, B. K., männlich, * 1956 und I. S., weiblich, * 1956, die gesichert an einer invasiven Aspergillose erkrankt waren, konnten mit der

Kombination von MagNA Pure™ und LightCycler™ nicht Aspergillus – positiv getestet werden.

Qiagen – PCR – ELISA lieferte 8 potentiell falsch positive Ergebnisse im Vergleich zur Kombination von MagNA Pure™ – PCR – ELISA.

Diagnostische Kriterien für eine invasive Aspergillose wurden von der European Organisation for Research on Treatment of Cancer (EORTC) erarbeitet (siehe 2.10.2).

Die Diagnosekriterien für eine invasive Aspergillose gibt Tabelle 24 wieder.

Tabelle 24: Diagnosekriterien für invasive Aspergillose (Ascioglu et al., 2002)

IA = invasive Aspergillose

Erfüllte Bedingungen	Stärke der Diagnose
Patientenrisikofaktoren klinische Symptome (positive) Labor - / radiologische Befunde positive Kultur bei Gewebsprobe	gesicherte IA
Patientenrisikofaktoren klinische Symptome (positive) Labor - / radiologische Befunde	wahrscheinliche IA
Patientenrisikofaktoren klinische Symptome oder (positive) Labor - / radiologische Befunde	mögliche IA

3.2 Evaluierung eines neuen Extraktionskits

Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete die Evaluierung eines neuen Extraktionskits für die Nukleinsäure - Extraktion mit dem MagNA Pure LC™, dem MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria Fungi) (siehe 2.4.5). Hierzu wurden Verdünnungsreihen von 22 verschiedenen Pilzen (siehe Tabelle 6) herangezogen. Die Nukleinsäuren dieser Pilze wurden mit dem

MagNA Pure LC™ Automaten und dem neuen Kit III extrahiert, und anschließend gelelektrophoretisch detektiert. Als Extraktionsvergleich diente die Extraktion mit dem bisher verwendeten Total NA Kit. Gleichzeitig wurde die Notwendigkeit der Zelldisruption durch Glaspartikel untersucht.

Bei der Extraktion mit dem Total NA Kit konnten 20 Pilze gelelektrophoretisch nachgewiesen werden, sowohl mit als auch ohne eine Vorbehandlung mit glass beads.

<u>Extraktion mit Total NA Kit</u>	nachweisbar
Vorbehandlung mit glass beads	20
Vorbehandlung ohne glass beads	20

Die zwei nicht nachweisbaren Pilze waren Aspergillus niger und Aspergillus terreus. Bei diesen Pilzen war durch Vorversuche heraus gefunden worden, dass sich ihre Zellwände nur durch eine spezielle Vorbehandlung mit flüssigem Stickstoff (N₂) aufbrechen lassen.

Bei der Extraktion der Nukleinsäuren der Pilze mit dem neuen Kit III konnten alle 22 Pilze, also auch Aspergillus niger und Aspergillus terreus, gelelektrophoretisch nachgewiesen werden.

<u>Extraktion mit Kit III</u>	nachweisbar
Vorbehandlung mit glass beads	22
Vorbehandlung ohne glass beads	22

Der Vergleich der Vorbehandlungsoptionen mit und ohne glass beads führte zu folgenden Ergebnis: die mit glass beads vorbereiteten Pilze, bei welchen also eine mechanische Ruptur der Zellwände stattgefunden hatte, konnten in der anschließenden Gelelektrophorese besser nachgewiesen werden, da hier deutlich hellere Banden sichtbar wurden.

Der Versuch, die fungale DNA mit der LightCycler™ - PCR zu detektieren, gelang nur bei 11 der 22 Pilze, unabhängig davon ob die Extraktion mit dem Total NA Kit oder dem Kit III stattgefunden hatte (Ausnahmen: Aspergillus

terreus und *Aspergillus niger*, s.o.). Verantwortlich hierfür waren die eingesetzten Sonden. Detektiert werden konnte die DNA folgender Pilze:

Aspergillus fumigatus

Acremonium chrysogenum

Aspergillus terreus

Aspergillus niger

Aspergillus versicolor

Absidia corymbifera

Penicillium brevicompactum

Penicillium chrysogenum

Paecilomyces variotii

Rhodotorula pilimanae

Scopulariopsis brevicaulis

3.3.1 Sensitivitätstestung Kit III

Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete die Sensitivitätstestung des neuen Kit III (DNA Isolation Kit III). Hierzu wurde eine *Aspergillus fumigatus* - Verdünnungsreihe (10e5 - 10e0) benutzt. Gleichzeitig diente dieser Versuch nochmals der Untersuchung der Vorteile einer Vorbehandlung der zu extrahierenden Proben mit glass beads zur Zellwanddisruption. Von den einzelnen Verdünnungsschritten wurden jeweils eine Probe mit und die andere ohne glass beads - Vorbehandlung in den MagNA Pure™ eingesetzt und die Nukleinsäuren mit dem Kit III extrahiert. Die anschließende Amplifikation erfolgte mit dem LightCycler™ - Verfahren.

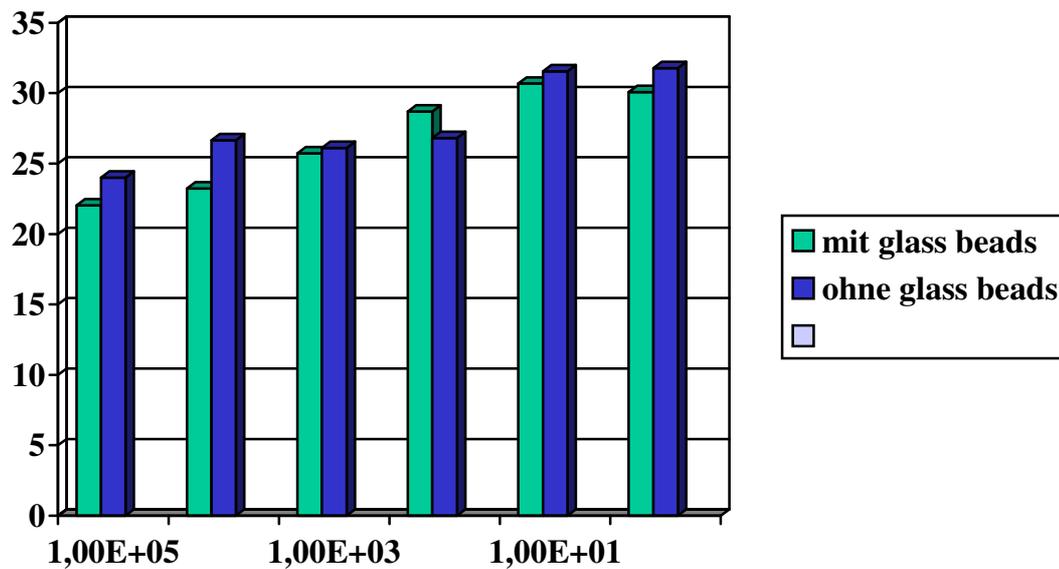
Die Ergebnisswerte werden als Angaben der jeweiligen crossing - points der einzelnen fungalen Nukleinsäuren wieder gegeben (vergleiche 2.6.3).

Das Ergebnis ist in Tabelle 25 und Diagramm 1 dargestellt.

Tabelle 25: crossing points, Kapitel 3.3.1

<u>Verdünnung</u>	<u>crossing point mit glass beads</u>	<u>crossing point ohne glass beads</u>
10e5	22,03	24,01
10e4	23,24	26,66
10e3	25,73	26,12
10e2	28,69	26,82
10e1	30,68	31,55
10e0	30,08	31,78

Diagramm 1: Ergebnisswerte der Sensitivitätstestung



Die Werte der crossing - points der einzelnen Nukleinsäuren fallen nach einer Vorbehandlung mit glass beads zwischen 1,5 % und 15 % niedriger aus, verglichen mit denen der nicht vorbehandelten Proben.

3.3.2.1 Reproduktions- und Kontaminationsversuche (I)

Um die Reproduzierbarkeit der Extraktionen des MagNA Pure LC™ Automaten und eine eventuell bei der Extraktion auftretende Kontamination der Proben zu untersuchen, wurden jeweils 10 Proben einer *Aspergillus fumigatus* Verdünnungsreihe der Konzentrationen 10e5 und 10e1 in den MAgNA Pure™ eingesetzt. Es wurden abwechselnd Proben der Konzentration 10e5 und Proben der Konzentration 10e1 eingesetzt um eine eventuell auftretende Kontamination der benachbarten Proben während der Extraktion feststellen zu können. Sollte bei der Extraktion eine Kontamination benachbarter Proben auftreten, könnte dies anschließend anhand der bei der Amplifikation gemessenen crossing - points festgestellt werden. Dann müssten sich vor allem die Werte der 10e1 - Konzentrationen untereinander deutlich unterscheiden. Die vorbehandelnde Zellwanddisruption erfolgte mit glass beads.

Die Ergebnisswerte sind Angaben der jeweiligen crossing - points und in Tabelle 26 und Diagramm 2 wieder gegeben (vergleiche 2.6.3).

Tabelle 26: crossing points, Kapitel 3.3.2.1

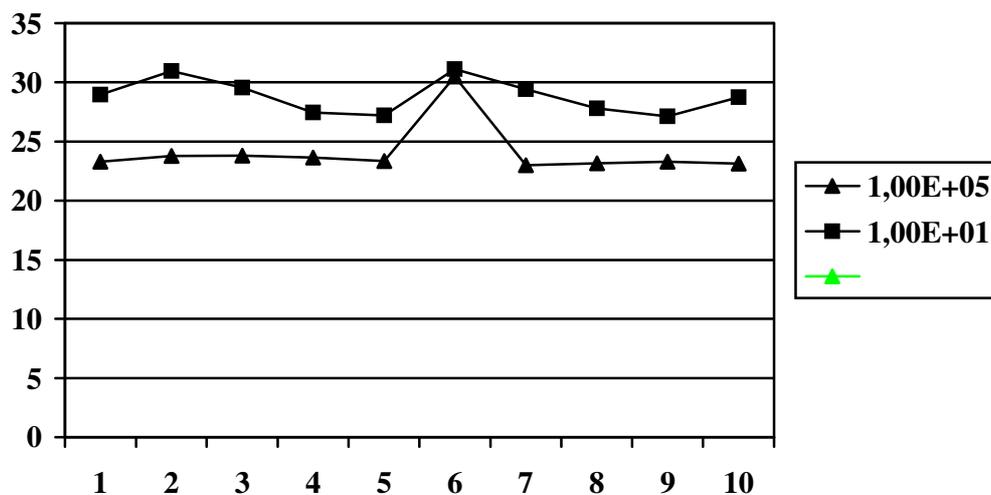
<u>Vedünnung</u>	<u>crossing points</u>
10e5	23,29 / 23,79 / 23,80 / 23,66 / 23,35 / 30,51 / 22,99 / 23,17 / 23,29 / 23,13
10e1	28,95 / 30,57 / 29,56 / 27,44 / 27,22 / 31,12 / 29,43 / 27,81 / 27,12 / 28,74

Statistik

Konzentration	10e5	10e1
Mean	23,60	28,3
Median	23,0	28,0
95% - Konifdenzintervall	21,98 – 25,22	27,29 – 29,31
Standardabweichung	2,27	1,42

Diagramm 2

Abszisse: crossing points, Ordinate: Reihenfolge



Alle crossing – points der jeweiligen Verdünnungskonzentrationen liegen bis auf eine Ausnahme (10e5, crossing - point 30,51) dicht bei einander, die Reproduzierbarkeit ist gegeben.

Es kann keine Kontamination der Proben festgestellt werden.

3.3.2.2 Reproduktions – und Kontaminationsversuche (II)

Es wurde jeweils die DNA von acht Aspergillus fumigatus Proben der Konzentration 10e3 mit dem MagNA Pure™ Kit III extrahiert. Die Extraktionen wurden zweimal durchgeführt. Die anschließende Amplifikation und Detektion erfolgte mit dem LightCycler™. Die Ergebniswerte sind Angaben der crossing - points.

Auswertung:

1. Aspergillus fumigatus 10e3 / Extraktion MagNA Pure™ Kit III / Lauf I

1. 26,87	5. 26,08	
2. 24,68	6. 27,65	
3. 25,45	7.25,26	
4. 25,64	8.26,90	<u>Durchschnitt: 26,06</u>

Mean	25,5
Median	25,5
95 % - Konfidenzintervall	24,73 – 26,27
Standardabweichung	0,926

2. Aspergillus fumigatus 10e3 / Extraktion MagNA Pure™ Kitt III / Lauf II

1. 26,12	5. 24,03	
2. 27,32	6. 28,58	
3. 28,83	7. 24,96	
4. 28,57	8. 24,69	<u>Durchschnitt: 26,64</u>

Mean	26,1
Median	26,5
95 % - Konfidenzintervall	24,55 – 27,70
Standardabweichung	1,89

3.5 MagNA Pure™ Extraktion ohne Vorbehandlung

Bei diesem Versuch sollte die Frage geklärt werden, ob auch aus nicht vorbehandelten Blutproben, also ohne Erythrozytenlyse und ohne Zellwanddisruption, eine Extraktion fungaler Nukleinsäuren mit dem DNA Isolation Kit III möglich ist. Die Versuchsanordnung gibt Tabelle 27 wieder.

Tabelle 27: Versuchsanordnung

Blutplasma	+ Aspergillus fumigatus 10e5 - 10e0
Blutserum	+ Aspergillus fumigatus 10e5 - 10e0
WBC (white blood cells)	+ Aspergillus fumigatus 10e5 - 10e0

Von den eingesetzten 18 Proben (siehe 2.3.1.2 und Tabelle 27) konnten nur 4 positiv getestet werden, die Plasmaproben welche mit den Verdünnungskonzentrationen 10e5 und 10e4, sowie die Serumproben welche

mit 10e5 und 10e3 versetzt worden waren. Die eingesetzten WBC (white blood cells) - Proben konnten nicht extrahiert werden.

Eine Vorbehandlung der Blutproben, also sowohl die Erythrozytenlyse, beispielsweise mit RCLB, als auch die Zellwanddisruption, zum Beispiel mit den glass beads, ist als essentiell für die Nukleinsäureextraktion anzusehen.

3.6 FastPrep™ / Fast DNA® Kit

Bisher wurden zur Zellwanddisruption glass beads eingesetzt. Da diese Methode jedoch auch einige Nachteile, beispielsweise die recht umständliche Handhabung oder die Kontaminationsgefahr mit sich bringt, wurde eine neue Möglichkeit der Wanddisruption getestet, die Vorbehandlung mit dem FastPrep™ Instrument (siehe 2.3.1.4).

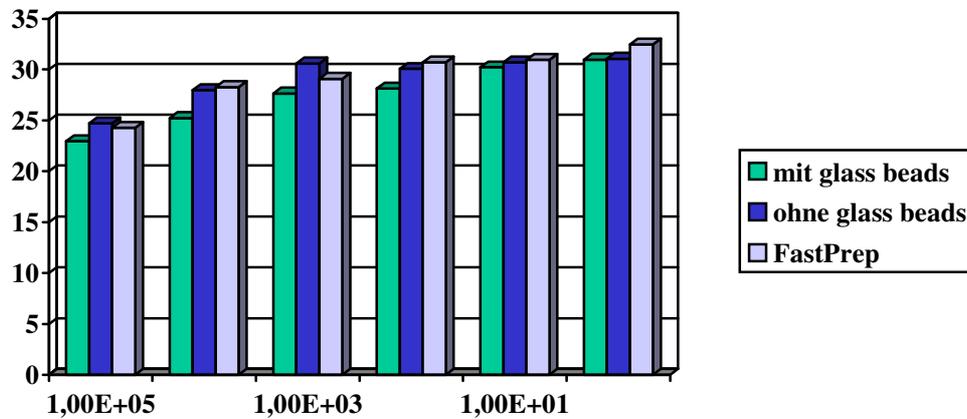
Zunächst wurde eine Aspergillus fumigatus Verdünnungsreihe (10e6 - 10e1) mit MagNA Pure™ Kit III extrahiert und mit LightCycler™ amplifiziert. Die Proben wurden jeweils entweder mit glass beads, ohne Vorbehandlung oder mit FastPrep™ (Einstellung 6,5 / 45 sec., 1000 µl Puffer, siehe 2.3.1.3) vorbehandelt. Die Ergebniswerte sind Angaben der jeweiligen crossing – points (siehe 2.6.3) und in Tabelle 28 und Diagramm 3 wiedergegeben.

Tabelle 28: Ergebnisse I, Kapitel 3.3

gb = Vorbehandlung mit glass beads, FP = FastPrep™ - Vorbehandlung

Konzentration	ohne Vorbehandlung	mit gb	FP
10e6	24,73	22,97	24,28
10e5	27,97	25,64	28,27
10e4	30,61	27,65	29,09
10e3	30,07	28,13	30,72
10e2	30,73	30,23	30,98
10e1	31,09	30,99	32,48

Diagramm 3



Bei Betrachtung der Ergebnisse stellt sich heraus, dass die FastPrep TM Methode zumindest bei der Vorbehandlung von *Aspergillus fumigatus* Proben keinen Extraktionsvorteil gegenüber der Vorbehandlung mit glass beads erbringen kann.

Im nächsten Versuch wurden Verdünnungsreihen von vier verschiedenen Pilzen (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus versicolor* und *Penicillium* spp.) in Konzentrationen von 10^5 - 10^2 verwendet. Hierbei wurden drei verschiedene Vorbehandlungsoptionen miteinander verglichen:

1. Vorbehandlung mit glass beads (gb)
2. Vorbehandlung mit FastPrep TM, Einstellung 6,5 / 45 sec., ohne Pufferzusatz (FP1)
3. Vorbehandlung mit FastPrep TM, Einstellung 4,5 / 15 sec., 1000 μ l Pufferzusatz (FP2)
4. nur *Penicillium* spp.: Vorbehandlung mit FastPrep TM, Einstellung 6,5 / 45 sec., 1000 μ l Pufferzusatz (FP3)

Die Ergebniswerte (Angaben der jeweiligen crossing – points, siehe 2.6.3) sind den Tabellen 29 – 31 zu entnehmen. *Aspergillus nidulans* konnte nicht vom LightCycler TM detektiert werden.

Tabelle 29: Ergebniswerte Aspergillus flavus

Konzentration	gb	FP1	FP2
10e5	21,78	27,76	26,71
10e4	24,96	29,67	29,76
10e3	27,09	30,98	-
10e2	30,63	32,23	-

Tabelle 30: Ergebniswerte Aspergillus versicolor

Konzentration	gb	FP1	FP2
10e5	27,82	28,99	30,52
10e4	28,55	31,03	31,58
10e3	32,39	-	-
10e2	-	-	32,70

Tabelle 31: Ergebniswerte Penicillium

Konzentration	gb	FP1	FP2	FP3
10e5	21,96	22,85	23,93	28,24
10e4	23,83	26,84	28,06	-
10e3	29,71	27,91	32,04	31,52
10e2	29,01	30,62	32,78	-

Vergleicht man die Ergebnisse miteinander wird deutlich, dass die FastPrep™ - Vorbehandlung der Proben, unabhängig von der Geräteeinstellung und unabhängig von der Puffer - Zugabe, gegenüber der Vorbehandlung mit glass beads keinen Extraktionsvorteil erbringt. Hinzu kommt noch ein höherer

Kostenpunkt, denn die Vorbehandlung mit FastPrep™ ist ungefähr dreimal so teuer wie die Benutzung der glass beads.

Vorbehandlungskosten:

glass beads : ca. 1.00,- EUR pro Probe

FastPrep™ : ca. 2.85,- EUR pro Probe

Die Vorbehandlung mit glass beads verbleibt bei Pilzproben die beste aller getesteten Möglichkeiten.

Ein Vorteil der FastPrep™ Anwendung könnte jedoch in der Vorbehandlung von ganzen Gewebestücken liegen. Hierzu wurden im Vorversuch Mäuse sezziert und deren innere Organe (Herz, Niere, Leber, Milz und Lunge) entnommen. Bisher standen zur Extraktionsvorbereitung von Gewebestücken nur die Möglichkeit der manuellen Zerkleinerung und anschließenden Lyse mit WCLB (white cell lysing buffer) zur Verfügung. Diese Methode hat die Nachteile des relativ großen Aufwandes (Zerkleinerung) und der hohen Zeitbeanspruchung (Lyse, 4 - 12 Stunden).

Die Gewebestücke wurden mit einem Skalpell zerkleinert, 12 Stunden mit WCLB inkubiert und anschließend zur Nukleinsäure - Extraktion in den MagNA Pure LC™ Automaten eingesetzt. Das Gerät konnte jedoch aufgrund der ungenügenden Verflüssigung und Zerkleinerung der Gewebestücke nicht effizient arbeiten, und es konnte keine DNA beziehungsweise RNA extrahiert werden.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden erneut Mäuseorgane zur Extraktion vorbereitet, dieses mal mit der FastPrep™ Methode. Die Gewebestücke wurden mit 1000 µl Puffer versetzt und anschließend in das FastPrep™ Gerät eingesetzt (Einstellung 6,5 / 45 sec.). Das anschließend Gewebehomogenisat wurde dann in den MagNA Pure™ überführt und die Nukleinsäuren konnten nun extrahiert werden.

Eine Übersicht über die extrahierte Menge an DNA beziehungsweise RNA, photometrisch gemessen, gibt Tabelle 32 wieder. Angegeben sind die Durchschnittsmengen der jeweiligen Organe.

Tabelle 32: Extraktionsmengen

<u>Organ</u>	<u>DNA Menge</u> (in 100 µl) (Durchschnitt Maus 1 - 3)	<u>RNA Menge</u> (in 100 µl) (Durchschnitt Maus 1 -3)
Herz	2,1 µg (Ratio: 1,79)	5,0 µg (Ratio: 1,89)
Lunge	8,6 µg (Ratio: 1,88)	6,0 µg (Ratio: 1,88)
Leber	15,9 µg (Ratio: 1,81)	8,8 µg (Ratio: 1,17)
Milz	22,0 µg (Ratio: 1,57)	7,6 µg (Ratio: 1,66)
Niere	13,8 µg (Ratio: 1,79)	8,8 µg (Ratio: 1,71)

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass bei der Aufspaltung fungaler Zellwände die FastPrep™ Methode der Vorbehandlung mit glass beads unterlegen ist.

FastPrep™ kann jedoch Vorteile bei der Lysierung von ganzen Gewebestücken, auch von Biopsaten, für sich verbuchen.

3.7 Auftauversuche

Dieser Versuchsreihe lag die Frage zugrunde, ob extrahierte DNA beim Einfrieren und Wiederauftauen einen Schaden nimmt.

Insgesamt wurden 8 Auftauversuche über einen Zeitraum von 4 Monaten vorgenommen. Zum jeweiligen Versuchszeitpunkt wurde die gesamte DNA - Menge aufgetaut, so dass die am Ende verbliebene Menge insgesamt 8 mal den Einfrierungs - und Auftauprozess durchlaufen hatte. Die Ergebnisse sind den Diagrammen 7 - 10 zu entnehmen. Die Abszissen - Werte sind Angaben der jeweiligen crossing - points, auf der Ordinate sind die Datumsangaben angegeben.

Sollten die Nukleinsäuren beim Einfrieren und Wiederauftauen einen Schaden erleiden, so müssten sich die Werte der jeweiligen crossing - points nach mehrmaligen Auftauen verschlechtern. Ebenso sollte ein Vorteil der in mit Silikon beschichteten Röhrchen gelagerten Nukleinsäuren sichtbar werden.

Diagramm 7:

Aspergillus fumigatus Verdünnungsreihe, 10e5 – 10e1,

Silikonröhrchen

Extrahiert am 07.10.2002

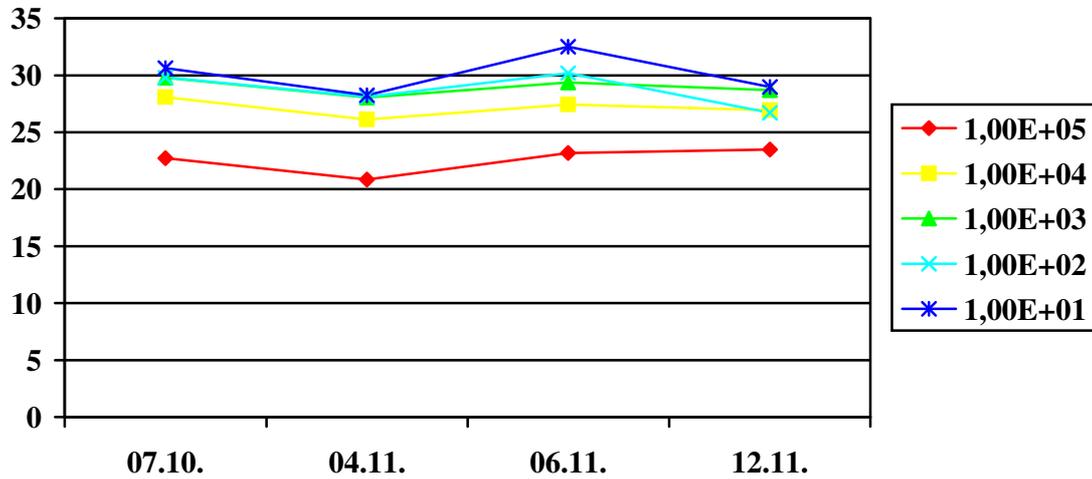


Diagramm 8:

Aspergillus fumigatus Verdünnungsreihe 10e5 – 10e1,

normalen Eppendorf Röhrchen

Extrahiert am 07.10.2002

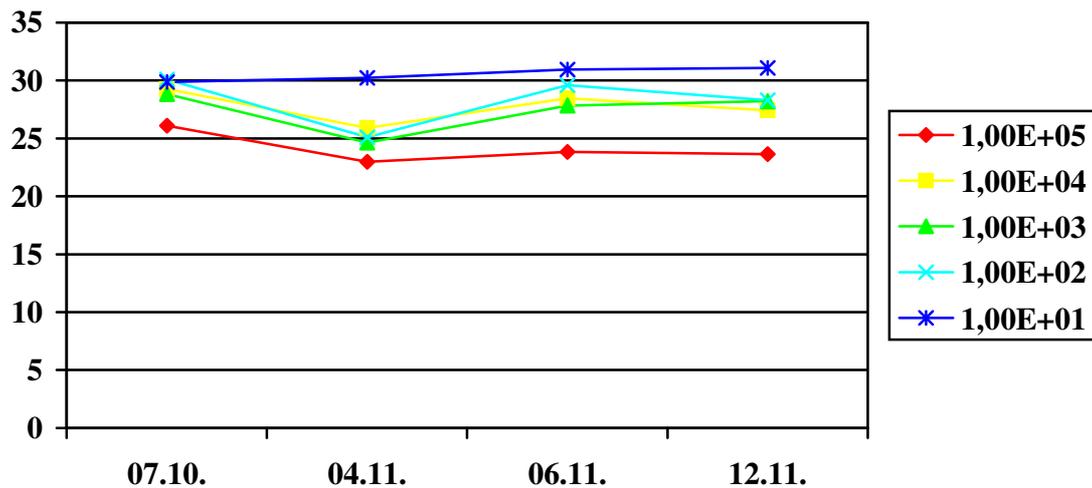


Diagramm 9:

Aspergillus fumigatus Verdünnungsreihe 10e5 und 10e1,
Silikonröhrchen versus **normale Eppendorf Röhrchen**

Extrahiert am 07.10.2002

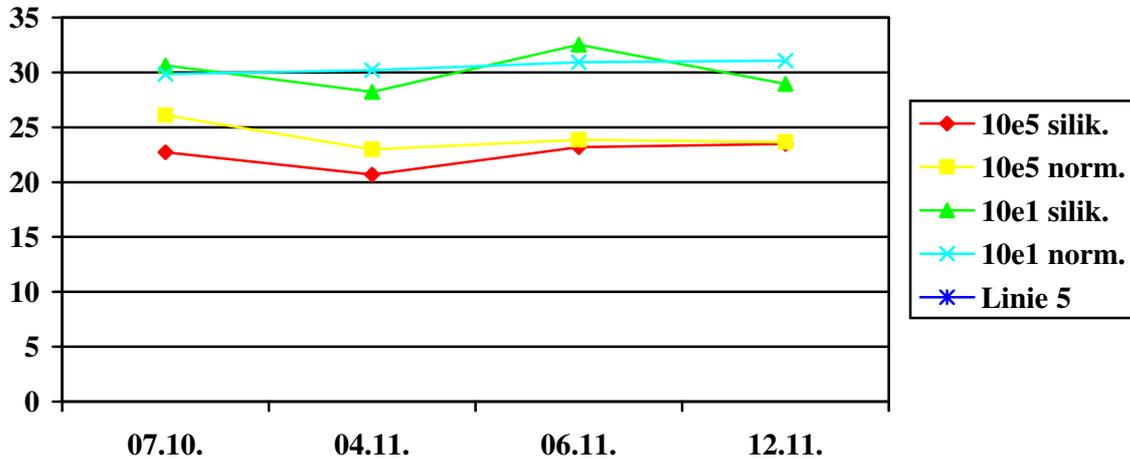
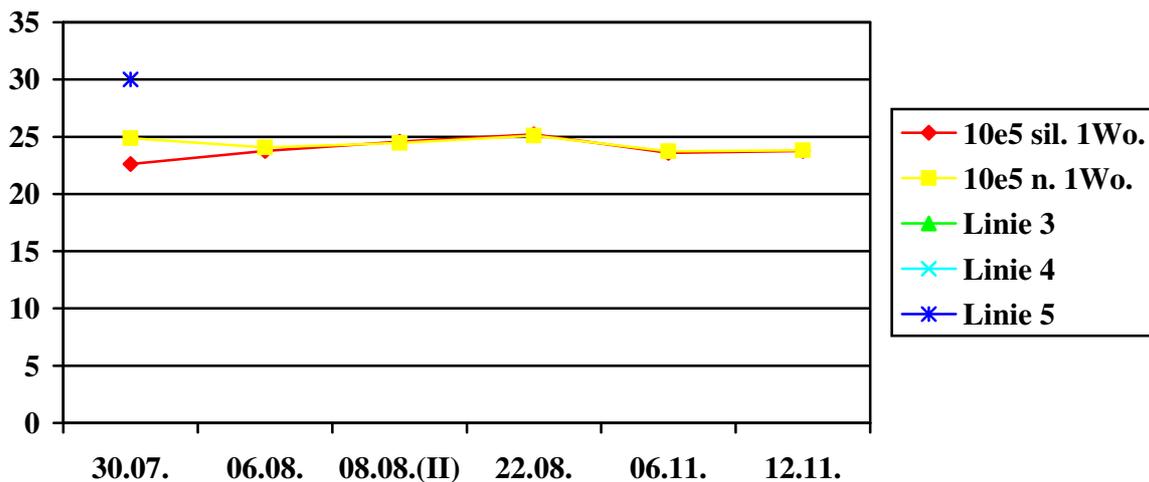


Diagramm 10:

Aspergillus fumigatus Verdünnung 10e5,
Slikonröhrchen versus **normale Eppendorf Röhrchen**

Messzeitraum 4 Monate

Extrahiert am 30.07.2002



Die Diagramme zeigen kaum eine Veränderung der Fluoreszenzwerte der jeweiligen Verdünnungskonzentrationen, sichtbar am annähernd horizontalen Verlauf der einzelnen Werte. Sollte die DNA einen Schaden genommen haben, so müsste sich ein steigender Verlauf darstellen.

Darüber hinaus lässt sich aus diesem Versuch schließen, dass eine Lagerung in mit Silikon beschichteten Röhrchen keine Vorteile für spätere Extraktionsergebnisse erbringt.

3.8 Inhibitions – bzw. Amplifikationskontrolle bei PCR - ELISA

Dieser Versuch diente dazu, eine Minimalkonzentration eines internen Standards herauszufinden, bei welcher eine Amplifikation von Pilz - DNA ohne Sensitivitätsverlust möglich wäre (siehe 2.8.2).

Es konnte hierbei eine Konzentration von 0,1 fg / μ l des artifiziellen Standards als Konzentration für einen internen Standard etabliert werden. In allen Proben, sowohl mit als auch ohne Zusatz von humaner DNA, konnte diese Konzentration nachgewiesen werden. Es trat hierbei kein Sensitivitätsverlust beim Nachweis von Aspergillus – DNA auf.

4. Diskussion

Auch im 21. Jahrhundert stellen immer neue Infektionskrankheiten die Medizin vor neue Herausforderungen. Eine sich ständig erhöhende Zahl von Infektionen und ein immer breiter werdendes Erregerspektrum erfordern neue Ansätze sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie und Prävention.

Pilzinfektionen und invasive Mykosen sind in zunehmendem Maße ein Problem für Patienten, bei denen therapeutisch eine Immunsuppression erforderlich wurde. Neben Patienten aus dem Bereich der Onkologie, der Hämatologie und der Transplantationsmedizin sind in zunehmendem Maße auch Patienten auf Intensivstationen, Frühgeborene und nicht zuletzt Patienten mit Autoimmunerkrankungen und HIV - Infizierte von Mykosen betroffen.

Candida Spezies machen die dritt - bis vierthäufigste Ursache von nosokomialen Blutinfektionen aus, und Aspergillus Spezies tauchen als die häufigste Ursache für die Mortalität bei Pneumonien bei Knochenmark – beziehungsweise Stammzelltransplantat – Empfängern auf (Walsh et al, 1999).

Aspergillus fumigatus ist der häufigste pathogene Schimmelpilz bei humanen Lebewesen und verursacht zum einen invasive Krankheiten bei immunsupprimierten Patienten und zum anderen Allergien bei Patienten mit atopischen Immunsystemen (Denning et al., 2002).

Die Therapie einer invasiven Mykose erschwert die Tatsache, daß die zur Verfügung stehenden Medikamente, verglichen mit den gegen bakterielle Infektionen einsetzbaren, nur relativ spärlich vorhanden sind. Bis zum Jahre 2001 waren nur zwei zugelassene antifungal wirksame Medikamente zur Aspergillose – Behandlung verfügbar (Denning et al., 2002).

Zudem haben die meisten dieser Medikamente ein mehr oder minder großes Nebenwirkungsrisiko, was die Behandlung bereits geschwächter Patienten erneut beeinträchtigt. Amphotericin B hat beispielsweise eine besonders gefährliche toxische Wirkung auf die Niere, was bis zu einem Funktionsausfall führen kann. Um die Nephrotoxizität einzuschränken, können Lipid – Formulierungen des Amphotericin B verabreicht werden. Somit sind Applikationen von höheren Dosen ohne Einschränkung der Nierenfunktion

möglich. Die Wirksamkeit und die Pharmakokinetik sind jedoch noch nicht abschließend geklärt. Hierdurch wird ersichtlich, daß eine prophylaktische Verabreichung äußerst problematisch und praktisch nicht durchführbar ist, auch im Hinblick auf mögliche Resistenzentwicklungen. Gegen Itraconazol (ein Antimykotikum mit einem breiten Wirkspektrum) resistente Aspergillus – Stämme wurden bereits vor einigen Jahren von Denning beschrieben (Denning, 1998).

Andere Antimykotika versprechen vielleicht bessere Möglichkeiten zur Prophylaxe. Fluconazol ist effektiv und relativ sicher bei einer Tagesdosis von 100 – 400 mg für die ersten ein bis drei Monate nach einer Lebertransplantation (Paya, 2002).

Die Behandlung mit einem neuen antifungalem Triazol, Voriconazol, führte zu excellenten klinischen Ergebnissen (Van't Hek et al., 1998).

Jedoch sollte eine antimykotische Medikation möglichst vor einer Organmanifestation begonnen werden um erfolgversprechend wirken zu können. Nicht zuletzt diese Tatsache führt dazu, dass die Mortalität meist sehr hoch ist. Im Patientenkollektiv der Stammzell - beziehungsweise Knochenmarkstransplantierten überleben etwa ein viertel eine Candidose nicht, 80 - 90 % können von einer Aspergillose nicht geheilt werden. Eine invasive Aspergillose tritt bei Stammzelltransplantat - Empfängern mit einer Inzidenz von 4 - 10 % (Jantunen et al., 2002) auf.

Bis vor kurzem waren für diese Infektionen vor allem *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* verantwortlich. Es zeigt sich aber ein immer größer werdendes Erregerspektrum, vor allem bei den Candidosen, wo mittlerweile non - *albicans* Spezies dominieren. Die Mehrheit dieser Infektionen werden mehrere Monate nach der Stammzelltransplantation diagnostiziert, und sind oftmals mit einer GvHD (graft versus host disease) assoziiert (Jantunen et al., 2002). Eine endgültige Diagnose kann oftmals erst post mortem gestellt werden.

Die wenigen Medikamente, die hohen Nebenwirkungsraten, und die meist fulminanten Krankheitsverläufe machen deutlich, daß für eine gute Prognose für den Patienten eine möglichst frühe Diagnose unabdingbar ist. Eine Diagnose, die alleine auf der klinischen Präsentation basiert, ist unsinnig (Muller et al., 2002). Klinische Symptome zeigen sich meist erst in einen fortgeschrittenen

Krankheitsstadium.

Bereits vor mehr als 20 Jahren wurde ein klarer Zusammenhang zwischen einer möglichst frühzeitigen Diagnose einer Aspergillose und dem Erfolg der daraufhin eingeleiteten antimykotischen Therapie bei Hochrisikopatienten beschrieben (Aisner et al., 1977).

Auch bildgebende Verfahren zur Diagnostik, wie beispielsweise die Computertomographie (CT), die mittels hochauflösender Bilder des Thorax eine Pilzinfektion zu erkennen hilft, werden oft erst spät aussagekräftig. Bei Patienten mit protrahierter Neutropenie sollte dennoch bei Auftreten von Fieber und klinischen Hinweiszeichen auf eine Mykose umgehend eine Computertomographie (HR – CT) veranlasst werden. Liefert eine radiologische Untersuchung Hinweise auf Infiltrate, so sollte ein Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) angeschlossen werden. Noduläre Infiltrate lassen sich mit dem sogenannten Crescent – of – air – Zeichen nachweisen. Frühe computertomographisch auftretende Zeichen, sogenannte HALO - Zeichen (griechisch: halos = der Hof), können nicht bei allen Patienten regelmäßig nachgewiesen werden. HALO – Zeichen bezeichnen die radiologische Darstellung einer Luftsichel um einen mykotischen Herd, eine bereits bestehende Nekrose, in welche Luft eingeschlossen wurde. Eine tägliche Computertomographie ist jedoch wegen der Strahlenbelastung und nicht zuletzt aufgrund der hohen Kosten nicht durchführbar, wodurch sich viele typische Frühzeichen der Beobachtung entziehen.

Ziel muss es also sein, Nachweisverfahren zu entwickeln und zu optimieren, die eine Diagnosestellung bereits vor einer Manifestation, beziehungsweise in einem unspezifischen Krankheitsstadium ermöglichen, und die Patienten dabei so gering wie möglich belasten. Hierfür bieten sich molekulare Testverfahren an.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Etablierung neuer automatisierter Testverfahren für die Extraktion, Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren aus humanpathogenen Pilzen zu optimieren. Die MagNA Pure Technik offeriert ein schnelles Protokoll für die automatische DNA – Isolation aus mehreren Pilzen und zeigt eine hohe Sensitivität und Reinheit (Loeffler et al, 2002).

Ein großes Problem stellt die oftmals sehr geringe Pilzlast bei Patienten mit einer invasiven Aspergillose dar. Es lassen sich des öfteren nur etwa 1 - 10 CFU (colony forming units) pro Milliliter im Blut des Infizierten nachweisen. Molekulare Diagnoseverfahren sollten also in der Lage sein, auch kleinste Mengen an fungalen Nukleinsäuren im Blut des Patienten nachweisen zu können. Die Detektionsgrenzen der meisten Testverfahren liegen bei etwa 10 CFU / ml, verschiedene Arbeiten berichten auch von einer Detektionsgrenze von 5 - 10 CFU / ml (Löffler et al, 2000 a). Eine Detektionsgrenze von 10 CFU / ml wird als hinreichend für eine Diagnose angesehen (Löffler et al, 1997), ein Grenzwert, der, wie verschiedene Reproduktionsversuche ergaben, auch in dieser Arbeit erzielt werden konnte. Bei der Detektion von Aspergillus – DNA mit der PCR – Methode stellte sich bei einem Vergleich zwischen Plasma – und Vollblutproben heraus, dass die Sensitivität bei den Plasmaproben geringer war als bei den Proben aus Vollblut, in beiden Fällen zeigte sich jedoch ein niedriges Detektionslimit von 10 CFU (Löffler et al, 2000 b).

Darüber hinaus muß die Diagnosemethode kontaminationsfrei ablaufen. Das Risiko einer Kontamination stellt sich insbesondere bei manuellen Diagnoseverfahren, da es hierbei leicht zu aerogenen Übertragungen von ubiquitär vorkommenden Aspergillus - Sporen kommen kann. Die hier eingesetzte Nukleinsäureextraktion mit dem MagNA Pure™ Automaten arbeitet als geschlossenes System, das Kontaminationsrisiko ist auf ein Minimum reduziert worden. Der MagNA Pure™ - Apparat ist ein von der Firma Roche® entwickelter Extraktionsroboter, der mit Hilfe von magnetischen Glaspartikeln und verschiedenen Wasch - und Elutionsschritten Nukleinsäuren aus verschiedenen Proben in kürzester Zeit gewinnen kann, und dabei als vollständig geschlossenes System arbeitet. Verschiedene Kontaminationsversuche haben keine Kontamination nachweisen können (siehe 3.3.2.1 und 3.3.2.2).

Da die zu untersuchenden Patientenproben, wie erwähnt, oftmals eine nur sehr geringe Pilzlast aufweisen, muß an eine automatische Nukleinsäure - Extraktion auch die Anforderung der Reproduzierbarkeit der ermittelten Testergebnisse gestellt werden.

In verschiedenen Reproduktionsversuchen, bei denen artifiziell „infizierte“ Blutproben eingesetzt wurden, konnten alle Proben mit 10 CFU / ml wiederholt extrahiert, amplifiziert und detektiert werden (3.3.2.1 und 3.3.2.2).

Die Kosten für eine DNA Extraktion aus Blut belaufen sich mit diesem Gerät auf etwa vier Euro pro Probe. Für eine vergleichbare manuelle DNA - Gewinnung sind ebenfalls etwa vier Euro je einzelner Probe zu veranschlagen, jedoch sind hierbei die höheren Personalkosten, bedingt durch den höheren Zeitaufwand, nicht mit eingerechnet worden.

Invasive Mykosen werden von immer mehr auftretenden Pilzspezies verursacht, von denen sich manche nur sehr schwer nachweisen lassen. In diesem Zusammenhang kam ein neuer Extraktionskit zur Anwendung, mit welchem es gelang, die DNA von 22 verschiedenen Pilzen zu extrahieren. Von diesen 22 Pilzen konnten mit dem bisherigen Extraktionskit nur 20 nachgewiesen werden. Bei den 2 nicht nachweisbaren Pilzen war in Vorversuchen herausgefunden worden, daß sich deren Zellwände nur durch eine spezielle Stickstoff - Vorbehandlung aufbrechen ließ (siehe 3.2).

Gleichzeitig wurde die Notwendigkeit der vorbereitenden Zellwanddisruption bestätigt (siehe 3.5 und 3.6). Die bereits eingesetzte und etablierte Vorbehandlung mit Glaspartikeln (glass beads), eine Möglichkeit der Eröffnung der Zellwände ohne chemische Zusätze und ohne großen mechanischen Aufwand, verblieb die beste aller getesteten Möglichkeiten. Die Notwendigkeit der Aufspaltung der Zellwände zeigte sich bei verschiedenen Versuchen, bei welchen eine rupturierende Vorbehandlung unterblieb (siehe 3.5). In diesem Zusammenhang wurde auch ein neues Gerät zur Zellaufspaltung getestet, der FastPrep ® Apparat der Firma bio101. Diese Methode konnte jedoch bei der fungalen Nukleinsäure - Gewinnung keine Vorteile gegenüber der Behandlung mit den Glaspartikeln vorweisen. Hinzu kommt noch der immer größer werdende Kostenfaktor, denn immerhin ist die FastPrep ™ - Vorbehandlung mit ungefähr 2,85,- Euro pro Probe fast dreimal so teuer wie die glass beads - Methode mit etwa 1,- Euro pro Probe (siehe 3.6).

Das FastPrep ™ Instrument bietet Vorteile bei der Vorbehandlung von Gewebestücken, beispielsweise auch von Proben aus Biopsien, wie anhand der

Zerkleinerungsergebnisse von Mäuseorganen festgestellt werden konnte. Ganze Organstücke konnten so präpariert werden, daß eine anschließende Nukleinsäureextraktion mit dem MagNA™ Pure Extraktionsautomaten möglich wurde (siehe 3.6).

Danach wurde der Frage auf den Grund gegangen, ob die extrahierte DNA bei einer üblichen Lagerung im eingefrorenen Zustand bei minus 20 ° C Schaden nimmt. Verschiedene Auftauversuche, die sich über einen Zeitraum von mehreren Monaten erstreckten, und bei denen unter anderem auch spezielle, mit Silikon beschichtete Aufbewahrungsbehälter zum Einsatz kamen, führten zu dem Ergebnis, daß die Menge an zu detektierender DNA durch diese Lagerung nicht geringer wurde. Ein lagerungsbedingter Schaden konnte sowohl für die Temperatur als auch für die Art der Behälter nicht nachgewiesen werden (siehe 3.7).

Die bedeutende Rolle der PCR zeigte sich unter anderem sich im Vergleich mit der kulturellen Nachweismethode. In experimentellen Tierversuchen konnte festgestellt werden, dass die PCR - Methode 19.4 mal sensitiver bezüglich der Detektion von Aspergillus – DNA als der Kulturnachweis war (Loeffler, et al, 2002).

Um die Geschwindigkeit einer standardisierten PCR – basierten Detektion von wichtigen Pilzen in klinischen Proben zu erhöhen, wurde eine Kombination eines kommerziell erhältlichen DNA – Extraktionskits mit der PCR – Amplifikation und Detektion der Amplifikate etabliert (Loeffler et al., 2002).

Inhibitoren stellen ein großes Problem bei der Extraktion von Nukleinsäuren dar. So kann im Blut beispielsweise Albumin als Inhibitor auftreten, welches in nicht ausreichendem Maße während der DNA – Extraktion eliminiert werden kann. Um hierfür eine Kontrolle zur Verfügung zu haben, wurde im Rahmen der PCR – ELISA Methode ein interner Standard zur Inhibitionskontrolle etabliert (siehe 3.8). Dieser Standard kann zukünftig als Amplifikationskontrolle bei der PCR - ELISA mitgeführt werden.

Schlussfolgerung und zukünftige Anwendungen

Von den 38 Patienten, deren Blutproben im Untersuchungszeitraum der vorliegenden Arbeit getestet wurden, hatten drei eine dokumentierte invasive Aspergillose.

Mit der Kombination von MagNA Pure™ und PCR - ELISA ist es gelungen, alle drei Patienten Aspergillus - positiv zu testen.

Auch die Kombination von Qiagen und PCR - ELISA lieferte bei diesen drei Patienten Aspergillus - positive Ergebnisse. Das Datum der ersten Positivtestung stimmte in beiden Kombinationen überein.

Im Vergleich zu MagNA Pure™ - PCR - ELISA lieferte Qiagen - PCR - ELISA acht potentiell falsch positive Ergebnisse.

Mit der Kombination von MagNA Pure™ und LightCycler™ ist es nur gelungen, einen Patienten positiv auf Aspergillus zu testen. Die beiden anderen Patienten, die ebenfalls gesichert an einer invasiven Aspergillose erkrankt waren, konnten hierbei nicht positiv getestet werden.

Die Daten der ersten Positivtestungen der jeweiligen Patienten stimmen sowohl bei der konventionellen Extraktion mit Qiagen als auch mit der automatisierten MagNA Pure™ Extraktion und der anschließenden Detektion mit PCR - ELISA überein. Die automatisierte Nukleinsäureextraktion mit dem MagNA Pure LC™ Automaten zeigt hier keine Nachteile gegenüber der manuellen Extraktion.

Im Untersuchungszeitraum dieser Arbeit war das Patientenkollektiv jedoch zu gering, um eine sichere Aussage darüber treffen zu können, ob zukünftig der alleinige Einsatz des MagNA Pure LC™ Extraktionsautomaten gerechtfertigt ist.

Auch die Einsatzfähigkeit des LightCycler™ Automaten kann aufgrund des kleinen Patientenkollektivs nicht abschließend beurteilt werden.

Eine Unsicherheit besteht bezüglich der Vergleichbarkeit von artifiziell beimpften Proben mit echten Patientenblutproben.

In der vorliegenden Arbeit kamen aufgrund des kleinen Patientenkollektivs auch künstlich mit fungalen Erregern infizierte Blutproben zum Einsatz.

Hierbei lieferte die automatische Nukleinsäureextraktion ausreichend sensitive Ergebnisse. Bis jetzt lassen sich jedoch noch keine sicheren Aussagen darüber machen, ob die hierbei eingesetzten Erreger mit denen im Blut von infizierten Patienten zu vergleichen sind.

Es besteht also die Notwendigkeit, die gewonnenen Ergebnisse auf größere Patientenkollektive zu übertragen, um eine sichere und alleinige Anwendung der automatischen Nukleinsäureextraktion und Detektion in der Diagnostik invasiver Mykosen gewährleisten zu können.

5. Literatur

- Aisner, J., Schimpff, S., Wiernik, P. (1977)
Treatment of invasive Aspergillosis: Relation of Early Diagnosis and Treatment Response
Annals of Internal Medicine, 86, 539-43
- Ascioglu, S., Rex, J.H., De Pauw, B., Bennett, J.E., Bille, J., Crokeart, F., Denning, D.W., Donnelly, J.P., Edwards, J.E., Erjavec, Z., Fiere, D., Lorotheolary, O., Maertens, J., Meis, J., Patterson, T.F., Ritter, J., Selleslag, D., Shah, P.M., Stevens, D.A., Walsh, T.J., Collectiv Name: Invasive Fungal Infections Cooperative Groop of the European Organisation for Research and Treatment oc Cancer, Collectiv Name: Mycosis Study Groop of the National Institute of Allergy and Infectious Deseases (2002)
Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus
Clin Infect Dis, 34, 7-14
- Baenkler, H.-W., Fritze, D., Füleßl, H.S., Goeckenjan, G., Hamm, C., Hebe, J., Hengstmann, J.H., Hörl, W.H., Klingmüller, D., Köster, R., Küchenhoff, J., Kuck, K.-H., Ludwig, M.M., Matzdorff, A., 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. (2001)
Innere Medizin
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U. (1997)
Pathologie
Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- Buitron Garcia, R., Romero Caballo, R., Cruz Talonia, F., Bonifaz, A., Zara Marquez, F. (2002)
Study on Candida no – albicans species and its relation to recurrent vulvovaginal candidiasis
Giniecol Obstet Mex, 70, 431-6
- Chen, S.C., Halliday, 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, 40, 333-5
- Denning, D.W. (1998)
Invasive aspergillosis
Clin Infect Dis, 26, 781-805
- Denning, D. (2000)
Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis
Lancet, 355, 423-24

Denning, D.W., Andreson, M.J., Turner, G., Latge, J.P., Bennett, J.W. (2002)
Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome
Lancet Infect Dis, 2, 251-3

Einsele, H., Bertz, H., Beyer, J., Kiehl, M.G., Runde, V., Kolb, H.-J., Holler, E., Beck, R., Schwerdfeger, R., Schumacher, U., Hebart, H., Martin, H., Kienast, J., Ullmann, A.J., Maschmeyer, G., Krüger, W., Link, H., Schmidt, C.A., Oettle, H., Klingebiel, Z., für die Arbeitsgemeinschaft Infektionen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (2001)
Epidemiologie und interventionelle Therapiestrategien infektiöser Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation
Dtsch Med Wochenschr, 126, 1278-84

Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Löffler, J., Rothenhöfer, I., Müller, C.A., Bowden, R.A., von Burik, J.A., Engelhard, D., Kanz, L., Schumacher, U. (1997)
Detection and indentifikation of fungal pathogens in blood by using molocular probes
J Clin Microbiol, 35, 1353-60

Gotway, M.B., Dawn, S.K., Caoili, E.M., Reddy, G.P., Araoz, P.A., Webb, W.R. (2002)
The radiologic spectrum of pulmonary *Aspergillus* infections
J Comput Assist Tomogr, 26, 159-73

Groll, A.H., Shah, P.M., Mentzel, C., Schneider, M., Just – Nübling, G., Hübner, K. (1996)
Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital
J Infect, 33, 23-32

Hebart, H., Bokemeyer, C., Löffler, J., Schumacher, U., Kanz, L., Einsele, H. (1999)
Management of invasive fungal infections in oncological patients
Onkologie, 22, 192-197

Herbrecht, R., Denning, D.W., Patterson, T.F., Bennett, J.E., Greene, R.E., Oestmann, J.W., Kern, W.V., Marr, K.A., Ribaud, P., Loroitholary, O., Sylvester, R., Rubin, R.H., Wingard, J.R., Stark, P., Durand, C., Caillot, D., Thiel, E., Chandrasekar, P.H., Hodges, M.R., Schlamm, H.T., Troke, P.F., de Pauw, B., Invasive Fungal Infecktions Groeu of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global *Aspergillus* Stud Group (2002)
Voriconazole versus amphotericin B for primary Therapy of invasive aspergillosis
N Engl J Med, 347, 408-15

Hoffmann, H.L., Rathbun, R.C. (2002)
Rewiew of the safety and efficacy of voriconazole
Expert Opin Investig Drugs, 11, 409-29

Jantunen, E., Anttila, V.J., Ruutu, T. (2002)
Aspergillus infections in allogenic stem cell transplant recipients: have we made any progress?
Bone Marrow Transplant, 30, 925-9

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

Am J Hematol, 72, 27-30

Letagé, J.P. (1999)

Aspergillus fumigatus and invasive aspergillosis

Clin Microbiol Rev, 12, 310-350

Libanore, M., Prini, E., Mazzetti, M., Barchi, E., Rause, E., Gritti, F.M., Bonazzi, L., Ghinelli, F. (2002)

Invasive aspergillosis in Italian AIDS patients

Infection, 30, 341-5

Löffler, J. (1997)

Etablierung und Evaluierung molekularbiologischer Nachweismethoden humanpathogener Pilze und Charakterisierung azolresistenter Pilzstämme isoliert aus immunsupprimierten Patienten

Dissertationsarbeit, Universität Tübingen, Fakultät für Biologie

Loeffler, J., Henke, N., Hebart, H., Schmidt, D., Hagemeyer, L., Schumacher, U., Einsele, H. (2000 a)

Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system

J Clin Microbiol, 38, 586-9

Loeffler, J., Hebart, H., Brauchle, U., Schumacher, U., Einsele, H. (2000 b)

Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of Aspergillus DNA by PCR

J Clin Microbiol, 38, 3830-3

Loeffler, J., Kloepfer, K., Hebart, H., Najvar, L., Graybill, J.R., Kirkpatrick, W.R., Patterson, T.F., Dietz, K., Bialek, R., Einsele, H. (2002a)

Polymerase chain reaction of aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis

J Infect Dis, 185, 1203-6

Loeffler, J., Hebart, H., Sepe, S., Schumacher, U., Klingebiel, T., Einsele, H. (2002b)

Detection of PCR – amplified fungal DNA by using a PCR – ELISA system

Mycol, 36, 275-9

Loeffler, J., Schmidt, K., Hebart, H., Schumacher, U., Einsele, H. (2002c)

Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system

J Clin Microbiol, 40, 2240-3

Lüllmann, H., Mohr, K. (1999)
Pharmakologie und Toxikologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Marr, K.A., Carter, R.A., Boeckh, M., Martin, P., Corey, L. (2002)
Invasive aspergillosis in allogenic stem cell transplant recipients: changes in
epidemiology and risk factors
Blood, 100, 4358-66

Marre, R., Mertens, Th., Trautmann, M., Vanek, E. (2000)
Klinische Infektologie
Urban & Fischer, München, Jena

Muller, F.M., Trusen, A., Weig, M. (2002)
Clinical manifestations and diagnosis of invasive aspergillosis in
immunocompromised children
Eur J Pediatr, 161, 563-74

Oethinger, M. (2000)
Mikrobiologie und Immunologie
Urban & Fischer, München, Jena

Paya, C.V. (2002)
Prevention of fungal infection in transplantation
Transpl Infect Dis, 4, 46-51

Omegari, k., Hashiguchi, K., Tomono, K., Tashiro, T., Kohno, S. (1999)
Invasive pulmonary aspergillosis diagnosed early by polymerase chain reaction
assay
Intern Med, 38, 744-6

Rankin, N.E. (1953)
Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with agranulocytosis and
antibiotic therapy
Br Med J, 183, 918-919

Stevens, D.A., Kan, V.L., Judson, M.A., Morrison, V.A., Dummer, S., Denning,
D.W., Bennett, J.E., Walsh, T.J., Patterson, T.F., Pankey, G.A. (2000)
Practice guidelines for diseases caused by Aspergillus
Clin Infect Dis, 30, 696-709

Van't Hek, L.G., Verweij, P.E., Weemaes, C.M., Van Dalen, R., Yntema, J.B., Meis,
J.F. (1998)
Successful treatment with voriconazole of invasive aspergillosis in chronic
granulomatous disease
Am J Respir Crit Care Med, 157, 1694-6

von Eiff, M., Roos, N., Schulten, R., Hesse, M., Zuhlsdorf, M., van de Loo, J. (1995)
Pulmonary Aspergillosis: early diagnosis improves survival
Respiration, 62, 431-7

Walsh, T.J., Hiemenz, J.W., Anaissie, E. (1996)
Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients
Infect Dis North, 10, 365-400

Walsh, T.J., Gonzalez, C., Lyman, C.A., Chanock, S.J., Pizzo, P.A. (1996)
Invasive fungal infections in children. Recent advances in diagnostics and treatment
Adv Pediatr Infect Dis, 11, 187-290

Walsh, T.J., Groll, A.H. (1999)
Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century
Transpl Infect Dis, 1, 247-61

Williamson, E.C.M., Millar, M.R., Steward, C.G., Cornish, J.M., Foot, A.B.M., Oakhill, A., Pamphilon, D.H., Reeves, B., Caul, E.O., Warnock, D.W., Marks, D.I. (1999)
Infections in adult undergoing unrelated donor bone marrow transplantation
Br J Haematol, 104, 560-568

www.biochem.roche.com

www.bio101.com

Anhang

Abkürzungen

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Asp.	Aspergillus
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	basepair / Basenpaar
°C	Grad Celsius
CFU	Colony forming units
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CLS-Y	Cell Lysis / DNA Solubilizing Solution for Yeast, Algae and Fungi
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie – Virus
CT	Computertomographie
CRP	C – reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiaminessäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EORTC	European Organisation for Research on Treatment of Cancer
FP	FastPrep

gb	Glass Beads
G-CSF	Granulozyten - Colony - Stimulating - Factor
GM-CSF	Granulozyten - Makrophagen - Colony - Stimulating - Factor
GvDH	Graft – versus – Host – Disease
GvH	Graft – versus – Host
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H ₂ O	Wasser
IFN γ	Interferon gamma
KMT	Knochenmarktransplantation
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIBIO	Mikrobiologie / mikrobiologische Untersuchung
min	Minute(n)
NaCl	Natriumchlorid
PCR	Polymerase – Chain – Reaktion
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
mRNA	mitochondrale Ribonukleinsäure
U / min	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde(n)
Taq Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
Tris	Trisoxymethylethylendiamin
WBC	White Blood Cells
WCLB	White Cell Lysis Buffer
ZNS	Zentrales Nervensystem

cm	Centimeter
cm ³	Kubikcentimeter
fg	Femtogramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
M	Molar
mM	Millimolar

Danksagung

Ich bedanke mich hiermit bei allen die mir bei der vorliegenden Arbeit mit Tat und Rat zur Seite standen, bei Hanna, die mich jederzeit unterstützte und bei meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. H. Einsele.

Besonderer Dank gilt meinem Freund Jürgen Löffler, Danke Jürgen.

Auch bedanke ich mich bei allen Labormitarbeitern, habt alle vielen Dank.

6. Lebenslauf

Name	Andreas Florian Fürchtegott Baumann
Geburtsdatum und Ort	29.10.1974 in Reutlingen
Eltern	Dr. med. Beata Gabriele Baumann, geb. Holzäpfel Dr. med. Lutz Götz Fürchtegott Baumann
Schulbildung	1981 - 1985 Grundschule Pfalzgrafenweiler 1985 - 1995 Keplergymnasium Freudenstadt 06/1995 Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst	11/1995 - 01/1996 Rettungshelfer im Rettungsdienst beim DRK, Kreisverband Freudenstadt
Universitätsausbildung	SS 1997 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard – Karls – Universität Tübingen 03/2000 Ärztliche Vorprüfung 03/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 08/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2003 – 2004 Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg Reutlingen <ol style="list-style-type: none">1. Tertial: Chirurgie2. Tertial: Innere Medizin3. Tertial: Radiologie 11/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Erteilung der Approbation als Arzt
Promotion	2001-2004 Promotion an der Universität Tübingen, Abteilung Innere Medizin II „Optimierung eines vollautomatisierten, PCR- basierten Nachweisverfahrens von DNA aus humanpathogenen Pilzen“