

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Etablierung und Evaluierung
einer vollautomatisierten Extraktionsmethode
für DNA aus humanpathogenen Pilzen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

KATHRIN DOROTHEE SCHMIDT

**aus
Leonberg**

2004

Dekan:

Professor. Dr. H. C. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Einsele

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Meinen Eltern...

Herzlichen Dank an...

...Herrn Professor Dr. med. Hermann Einsele für die Überlassung des Themas, die hilfreichen und wertvollen Diskussionen und die außerordentlich freundliche Unterstützung in allen Phasen der Durchführung dieser Arbeit – vielen Dank für alles!

...Herrn PD Dr. med. Holger Hebart gilt mein Dank dafür, dass diese Arbeit trotz gewisser Startschwierigkeiten erfolgreich abgeschlossen werden konnte.

...Frau PD Dr. med. Ulrike Schumacher vielen Dank für die freundliche Unterstützung bei allen mikrobiologischen Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit auftauchten, und nicht zuletzt für die Beurteilung dieser Dissertationsschrift.

...Herrn Dr. rer. nat. Jürgen H. Löffler für die exzellente Betreuung bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit, die unendliche Geduld und den unerschütterlichen Optimismus, mit welchen er jeglichem Problem entgegentrat. Ohne Deine Motivation würde diese Arbeit wohl nicht existieren.

...Friederike Frank, Ingrid Kumbier und Ingeborg Wagner für die hervorragende technische und oft auch sehr hilfreiche moralische Unterstützung während meiner Laborzeit.

...meinen Mitdoktoranden, all jenen die vor oder nach mir angefangen haben, sich mit ähnlichen Fragestellungen und Techniken auseinander zu setzen – Danke für die gegenseitige Motivation und Unterstützung.

...Uli für die stets lebhaften und erfrischenden Diskussionen - auch wenn wir nicht immer einer Meinung waren - und für Deinen Humor.

...Jürgen, Dir danke ich für die magische Zeit in Florida und alles, was danach kam – viel zuviel, um es hier aufzuzählen - und womit am Anfang dieser Arbeit kein Mensch rechnen konnte...

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern – ohne Euch wäre all dies niemals möglich gewesen. Ihr wart immer für mich da, ob während des Studiums oder in allen Lebenslagen – habt so vielen Dank für all das!

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Risikopatienten	1
1.2	Krankheitsbilder	2
1.3	Inzidenz	4
1.4	Diagnostik	5
	1.4.1 Molekularbiologische Techniken	7
1.5	Therapie	8
1.6	MagNA Pure LC TM Instrument	10
1.7	Zielsetzung	11
2	<u>Patienten, Material und Methoden</u>	13
2.1	Pilzkulturen	13
	2.1.1 Herstellung von Verdünnungsreihen	14
2.2	Kontaminationsmonitoring	14
2.3	Manuelle DNA-Extraktion	14
	2.3.1 Extraktion aus Pilzkulturen	14
	2.3.2 Extraktion aus inokulierten EDTA-Blutproben	15
	2.3.3 DNA-Extraktion aus Gewebe	16
	2.3.4 DNA-Extraktion aus Bronchoalveolärer Lavage	16
	2.3.5 QIAamp Tissue Kit	16
2.4	Automatisierte DNA-Extraktion	17
	2.4.1 Vorbehandlung der Proben	17
	2.4.1.1 Zelldisruption	17
	2.4.1.2 Flüssiger Stickstoff und Hitze	17
	2.4.2 MagNA Pure LC TM	18
	2.4.2.1 Setup der Software	20
	2.4.2.2 Vorbereitung des Geräts	20
	2.4.2.3 Extraktionsprotokolle	21
2.5	Qualitätskontrolle der extrahierten DNA	21
2.6	Amplifikations- und Detektionsprotokolle	23

2.6.1	Target-Sequenz der Amplifikationen: 18 ssu rDNA	23
2.6.2	LightCycler PCR	24
2.6.2.1	LightCycler Sonden	25
2.6.2.2	Schmelzkurvenanalyse	27
2.6.3	Konventionelle PCR	27
2.6.4	PCR-ELISA	29
2.6.5	Gelelektrophorese	30
2.7	Sequenzierung	31
2.8	Patienten	32
3	<u>Ergebnisse</u>	34
3.1	Modifikation der etablierten DNA-Extraktion	34
3.1.1	Parallele Lyse von Erythrozyten und Leukozyten	34
3.1.2	Vorgeschalteter DNase-Verdau	34
3.1.3	Lyticase und MagNA Pure LC TM	37
3.2	Zelldisruption durch Glaspartikel	37
3.2.1	Sensitivität	39
	Verdünnungsreihen	39
	Blutproben	40
3.3	MagNA Pure LC TM Protokolle	41
3.4	DNA-Extraktion aus verschiedenen Pilzspezies mit MagNA Pure	41
3.5	Spezifität	42
3.6	Kontaminationskontrolle	45
3.7	Quantifizierung der MagNA Pure LC TM extrahierten DNA	46
3.7.1	Reproduzierbarkeit	47
3.8	Sequenzierung	49
3.9	Analyse von Patientenproben	49
3.10	Vergleich mit klinischen Daten	50
4	<u>Diskussion</u>	52
	Zukünftige Anwendungen	59

5	<u>Zusammenfassung</u>	62
6	Veröffentlichungen	64
7	Abkürzungsverzeichnis	65
8	Herkunftsbezeichnungen	68
9	<u>Literaturverzeichnis</u>	70

1 Einleitung

1.1 Risikopatienten

Der immense Fortschritt, den die Heilkunde in den vergangenen Jahrzehnten erreicht hat, konfrontiert die moderne Medizin mit einer zunehmenden Zahl von Infektionen, ausgelöst durch teilweise wenig erforschte Erreger. Diagnostik und Behandlung dieser Infektionskrankheiten stellen neue Herausforderungen für die heutige Klinik dar.

Während in der Vergangenheit Pilzinfektionen meist nur auf Haut oder Schleimhäuten beobachtet werden konnten, sind seit der Einführung der Kortikoidtherapie in den 50er Jahren invasive Infektionen mit fakultativ pathogenen Pilzarten eine mit wachsender Häufigkeit beschriebene Komplikation bei immunsupprimierten Patienten. Die Erstbeschreibung einer invasiven Aspergillose bei einem Patienten mit Agranulozytose erfolgte durch Rankin im Jahre 1953 (Rankin, 1953).

In den vergangenen Jahrzehnten sind systemische Pilzinfektionen immer häufiger Ursache von Morbidität und Mortalität bei der zunehmenden Zahl immuninkompetenter Patienten geworden (Bodey et al., 1992, Chandrasekar et al., 1995, Groll et al., 1996). Fortschritte in der Neonatologie, Transplantations- und Intensivmedizin, sowie die Anwendung intensivierter Chemotherapieschemata in der Hämatonkologie mit myeloablativer Therapie, Knochenmark- und Stammzelltransplantation (KMT, bzw. SZT), haben das Kollektiv immunkompromittierter und somit infektionsgefährdeter Patienten stark anwachsen lassen. Während bakterielle Infektionen durch die Kombination hochpotenter Antibiotika als Komplikation in den Hintergrund treten, gefährden Viren wie Cytomegalievirus und andere Herpesviren, sowie Pilze diese Patientenkollektive in zunehmendem Maße (Williamson et al., 1999).

Mit dem Schweregrad der angewandten Immunsuppressions-Schemata wächst die Anzahl und das Spektrum der Erreger generalisierter Mykosen; ehemals als apathogen angesehene und seltene Pilzspezies verursachen heute immer mehr Infektionen bei diesem Patientenkollektiv (Grauer et al., 1993, Groll et al., 1996).

Prolongierte Neutropeniephasen, nicht HLA-identische KMT / SZT, die Anwendung von Breitspektrum-Antibiotika, bestehende virale oder bakterielle Infektionen, sowie

lange persistierende zentrale Zugänge bei Patienten in Intensivstationen stellen weitere Risikofaktoren für die Entwicklung invasiver Mykosen dar (Einsele et al., 2001, Morrison et al., 1994, Williamson et al., 1999).

Zusätzlich zu den Personen, bei denen das Immundefizit medikamentös induziert worden ist, sind Frühgeborene, Verbrennungsoffer und Patienten mit HIV, hereditären Immundefekten, akuten Leukämien oder Cystischer Fibrose von Pilzinfektionen betroffen. Aufgrund der eingeschränkten Immunkompetenz können diese Infektionen invadieren und die Mortalität dieser Patienten bei generell verbesserten Therapieoptionen der Grunderkrankung erheblich erhöhen. Die unzureichende Funktion des unspezifischen wie des spezifischen Immunsystems, zusammen mit der gestörten Barrierefunktion der Mucosa, ermöglichen die Generalisierung fungaler Infektionen.

Die prophylaktische Gabe von Antimykotika konnte die Inzidenz der Infektionen zwar teilweise senken, birgt aber die Gefahr zunehmender Resistenzentwicklungen, was sich in der steigenden Zahl der Infektionen mit resistenten Pilzstämmen gezeigt hat (De Marie, 2000). Des Weiteren ist eine systemische Prophylaxe aufgrund hoher Nebenwirkungsraten und enormer Kosten schwer praktikabel.

1.2 Krankheitsbilder

Das Spektrum beobachteter Pilzinfektionen reicht von Besiedlung der Schleimhäute des Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts mit fakultativ pathogenen Erregern aus den Familien der Spross- und Schimmelpilze, bis hin zu generalisierten systemischen Mykosen.

Die primärpathogenen dimorphen Pilzgattungen *Coccidioides*, *Histoplasma* und *Blastomyces*, welche in weiten Teilen Amerikas und Afrikas endemisch auftreten, verursachen auch beim immunkompetenten Menschen Infektionen, die sich nach aerogen Übertragung primär meist pulmonal manifestieren, aber auch als systemische Mykosen auftreten können.

Infektionen mit *Aspergillus* Spezies werden hauptsächlich durch *A. fumigatus*, seltener durch *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. flavus* oder *A. niger* verursacht. Die Infektion erfolgt

aerogen durch ubiquitär vorkommende alveolargängige Konidien und manifestiert sich primär pulmonal als akute, beziehungsweise chronische Pneumonie, allergische bronchopulmonale Aspergillose oder in präformierten Kavernen als Aspergillom (Latgé, 1999, Denning, 1998). Sekundär kann es bei insuffizienter lokaler Abwehr zur Invasion der Erreger in Blutgefäße mit konsekutiver Fungämie und systemischer Mykose kommen. Absiedlungen treten in zirka 25% der Fälle auf (Denning, 1996) und finden sich hauptsächlich in der Leber, Milz und im zentralen Nervensystem, wobei letztere Manifestation in der Regel einen fatalen Verlauf nimmt (Latgé, 1999).

In neuerer Zeit sind auch Infektionen mit weiteren selteneren Schimmelpilzen wie *Paecilomyces variotii*, *Alternaria* sp. und *Mucorales* beobachtet worden (Hebart et al., 1999).

Erreger der Gattung *Candida*, hier allen voran *C. albicans*, gefolgt von *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* dringen hauptsächlich über die Mucosa des Gastrointestinaltraktes oder über Wunden in den Körper ein, um auf dem Blutwege zu disseminieren. Risikofaktoren für eine systemische Candidiasis bestehen unter anderem in vorausgegangener Kolonisation des Magen-Darm Trakts, lang liegenden zentralvenösen Kathetern und großflächigen Wunden, wie z. B. Verbrennungen. Insbesondere bei Frühgeborenen besteht aufgrund des noch mangelhaft ausgebildeten konnatalen Immunsystems ein erhöhtes Risiko, eine invasive Candidose zu entwickeln.

Die Manifestationsform einer Candidainfektion hängt von der Grunderkrankung sowie von prädisponierenden Faktoren ab. Eine oropharyngeale oder ösophageale Candidiasis tritt häufig nach Antibiotikatherapie, bei Patienten mit Diabetes mellitus, oder bei zugrundeliegenden zellulärem Immundefekten in Erscheinung. Die disseminierte Candidose tritt bei Neutropenie als akute oder chronische Erkrankung auf. Im Akutfall besteht ein septisches Krankheitsbild mit Fungämie und multiplen viszeralen wie kutanen Läsionen. Eine chronifizierte Candidiasis ist durch hepatolienale Herdbefunde bei fehlender Fungämie charakterisiert (Walsh et al., 1996)

Generell bedeutet eine ZNS-Manifestation der Mykose, häufig unter Ausbildung von Hirnabszessen, anämischen Infarzierungen oder Hämorrhagien, eine schlechte Prognose für den Patienten. Zentrale Absiedlungen werden bei Empfängern eines Knochenmark-

Transplantats zu 50 % von Aspergillus- und zu 25 % von Candida-Spezies verursacht (Denning, 1998).

Pneumocystis carinii, ein Erreger, welcher erst in neuerer Zeit nicht mehr den Protozoen, sondern aufgrund von Nukleinsäureanalysen phylogenetisch eher den Pilzen zugeordnet wird, verursacht sowohl bei Immunsupprimierten als auch insbesondere bei HIV-infizierten Patienten Pneumonien. Diese werden wie auch durch *Cryptococcus neoformans* bedingte Pneumonien und Meningoenzephalitiden zu den AIDS-definierenden opportunistischen Infektionen gerechnet.

Zunehmend werden Infektionen mit bisher nicht als humanpathogen geltenden Pilzspezies oder seltenen Pilzgattungen wie *Rhizopus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Malassezia*, *Pseudoallescheria* und *Scedosporium* beobachtet (Hebart et al., 1999).

Aus den beschriebenen Entwicklungen wird deutlich, dass Pilzinfektionen in Zukunft besondere Anforderungen sowohl an die Anwendung moderner diagnostischer Methoden, wie auch an die Entwicklung neuer Therapieoptionen stellen werden.

1.3 Inzidenz

Erreger invasiver Mykosen sind insbesondere *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* und eine zunehmende Zahl von non-*albicans* Candidaspezies (Löffler et al., 2000a)

Die Inzidenz systemischer Pilzinfektionen ist im letzten Jahrzehnt auf bis zu 20 % bei Hochrisiko-Patienten nach allogener KMT / SZT angestiegen (Einsele et al., 2001). In 30 % der Fälle handelt es sich um invasive Infektionen mit *Aspergillus*-Arten, in 7 % um generalisierte Candidiasis. Die Mortalität o.a. Infektionen wird auch unter adäquater Therapie mit 25 % für Candidosen und bis zu 99 % im Falle von Aspergillosen beschrieben (Denning, 1998, Latgé, 1999, Wenzel, 1995).

Die durchschnittliche Inzidenz invasiver Aspergillosen wird in Abhängigkeit von der Grunderkrankung folgendermaßen angegeben: 5 – 25 % der Patienten mit akuter Leukämie, 5 – 10 % der Empfänger einer allogenen Knochenmarktransplantation und 0,5 – 5 % nach autologer KMT, nach zytotoxischer Therapie hämatoonkologischer Erkrankungen oder Organtransplantation (höchste Inzidenz bei Empfängern eines Herz-Lungen Transplantats, gefolgt in abnehmender Häufigkeit von Leber- Herz-, Lungen-

und Nierentransplantationen). Außerdem entwickeln 1 – 12 % aller AIDS-Patienten und 25 – 40 % der Patienten, die unter chronischer Granulomatose leiden eine invasive Aspergillose als infektiöse Komplikation der Grunderkrankung. Die invasive Aspergillose (IA) stellt heute eine der Haupttodesursachen in Hämatonkologischen- und Organtransplantationszentren dar (Denning, 1998, Latgé, 1999).

Individuelle Faktoren, wie vorangegangene Kolonisation der Schleimhäute oder Pilzinfektionen in der Anamnese, Entwicklung einer Transplantat-Gegen-Wirt-Reaktion („Graft-versus-Host Disease“, GvHD) oder eines Rezidivs der Grunderkrankung mit der Notwendigkeit einer Intensivierung der Immunsuppression unter Anwendung von Kortikosteroiden, beeinflussen die Prognose des einzelnen Patienten negativ (Einsele et al. 2001). Ein entscheidender prognostischer Faktor ist ferner der Zeitpunkt der Diagnosestellung und konsekutiven Einleitung einer adäquaten Therapie, da die Ansprechrate auf eine antimykotische Therapie mit Fortschreiten der Infektion abnimmt.

Die tatsächliche Inzidenz systemischer Mykosen wird möglicherweise sogar unterschätzt, da nicht in ausreichendem Maße sensitive Testverfahren etabliert sind.

1.4 Diagnostik

Die Diagnostik invasiver Mykosen gestaltet sich insbesondere deshalb schwierig, weil die klinischen Zeichen sehr unspezifisch und variabel sind. Eine febrile Neutropenie lenkt beim entsprechenden Risikokollektiv den klinischen Verdacht auf eine invasive Mykose, kann jedoch auch auf andere bakterielle wie virale Infektionen zurückzuführen sein (Willamson et al., 1999).

Die klassische Symptomatik bei pulmonaler Manifestation einer Aspergillose äußert sich in virostatika- / antibiotikaresistentem Fieber mit Dyspnoe, eventuell Hämoptysen, atemabhängigen Schmerzen und auskultatorisch pneumonieverdächtigen Befunden (Latgé, 1999, Denning, 1998).

Bildgebende Verfahren sind erst spät diagnostisch verwertbar, da pulmonale Infiltrate, meist in Form kleiner Rundherde mit dem typischen „Halo-“ oder „crescent-of-air-“

Zeichen, auf Röntgenaufnahmen des Thorax erst in Progression der Erkrankung auftreten (Hebart et al. 1999). Computertomographische Aufnahmen in dünnen Schichten bieten eine höhere Sensitivität, ihre diagnostische Interpretation ist jedoch anspruchsvoll und die spezifische Charakterisierung eines Erregers anhand einer CT-Aufnahme nicht möglich.

Die Möglichkeit des mikroskopischen Nachweises von Hyphen und Sporen besteht in Präparaten von bronchoalveolärer Lavage, Sputum, Sinuslavagen und Biopsaten. Wenn in speziell angefärbten Präparaten (KOH- oder Grocott-Gomori Methenamin-Silber-Färbung) entsprechende Strukturen identifiziert werden können, so ist eine sichere morphologische Differenzierung beispielsweise zwischen Aspergillen, Fusarien, *Pseudoallescheria boydii* und *Scopulariopsis* nicht möglich. Die Spezifität des Verfahrens ist nicht ausreichend für eine sichere Diagnose, obwohl bei Auftreten entsprechender Strukturen in sterilem Probenmaterial die Verifizierung einer Pilzinfektion innerhalb kurzer Zeit möglich ist (Denning, 1998, Jones, 1990).

Die meisten Fälle invasiver Mykosen, insbesondere IA, werden erst post mortem durch Gewebehistologie und Immunhistochemie bestätigt (Bodey et al., 1992, Latgé, 1999).

Während Blutkulturen zur Diagnostik von *Candida*-Infektionen eingeschränkt geeignet sind, da es zu ca. 50 – 70 % falsch negativen Ergebnissen kommt, verbleiben Blutkulturen auch bei Patienten mit gesicherter invasiver Aspergillose in nahezu 100 % der Fälle negativ (Duthie & Denning, 1995). Die Invasion der Erreger in Blutgefäße führt zu Thrombosen und Infarzierungen, mit konsekutiv verminderter Perfusion der betroffenen Gebiete. Eine weitere Ursache für die geringe Sensitivität von Blutkulturen ist möglicherweise in der Immunantwort des betroffenen Organismus zu suchen, der durch zelluläre und humorale Abwehrreaktionen die Vitalität der Pilzzellen zerstört (Löffler et al., 2002). Da mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion fungale DNA sowohl in Vollblut als auch in Plasma nachweisbar ist, sind möglicherweise freie DNA und Kompartimente zerstörter Pilzzellen im Blut präsent.

Kulturen von BAL, Sinuslavage, Sputum oder Probeexzisionen lassen sich anzüchten, sind jedoch aufgrund hohen Kontaminationsrisikos nur schwer diagnostisch zu interpretieren und eine Differenzierung auf Speziesebene ist oft nicht eindeutig.

Generell ist die Gewinnung von Biopsiematerialien und BAL beim betroffenen Patientenkollektiv aufgrund häufig auftretender Thrombozytopenie und des reduzierten Allgemeinzustands nicht immer möglich oder mit einem hohen Komplikationsrisiko behaftet.

Kommerziell erhältliche Antigenteste zum Nachweis von Galactomannan als Polysaccharidantigen der Aspergilluszellwand (Platelia, Pastorex, Sanofi Diagnostic Pasteur), sind nicht ausreichend sensitiv (unter 70 %) und liefern keine quantitativen Ergebnisse. Außerdem sind Kreuzreaktionen mit *Penicillium* spp. und *Alternaria alternata* beschrieben worden, was einen spezifischen Erregernachweis einschränkt (Latgé, 1999). Antigenassays zum Nachweis von Candidazellwandkomponenten in Kombination mit Blutkultur- und Antikörpernachweisen scheinen mit einer Sensitivität von 80 % und Spezifität von 93 % eingeschränkt zur Diagnostik geeignet (Yera et al., 2001).

1.4.1 Molekularbiologische Techniken

In den letzten Jahren sind zunehmend auch für den Nachweis und die Charakterisierung von Pilzpathogenen molekulare biologische Methoden, basierend auf der Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1988) eingesetzt worden. Mehrere Forschungsgruppen haben die Amplifizierung fungaler DNA mit Hilfe spezifischer Primer beschrieben. Dabei sind speziesspezifische, beziehungsweise panfungale Gensequenzen ausgewählt worden. Als Zielsequenzen der Amplifikation sind ribosomale RNA, Gene, die für Hitzeschockproteine, Aktin oder Lanosterol 14-alpha-Demethylase codieren, sowie mitochondriale Gene verwendet worden. Die in dieser Arbeit angewandten Primer sind komplementär zu hochkonservierten Sequenzen der 18s rRNA Genregion und ermöglichen daher eine Amplifikation der meisten klinisch relevanten fungalen Pathogene (Einsele et al., 1997, Löffler, 1997).

Eine Differenzierung der Amplifikate auf Gattungs- und Speziesebene kann durch Hybridisierungsreaktionen mit spezifischen Oligonukleotiden im Rahmen von Blotting-

oder PCR-ELISA Techniken oder durch Restriktionsenzym- sowie Einzelstrang-polymorphismus - Analysen erfolgen.

Die hier eingesetzte Technik des LightCyclers™ besteht in einer quantitativer Echtzeit-PCR, bei der speziesspezifische Fluoreszenz-markierte Oligonukleotidsonden innerhalb der amplifizierten Gensequenz binden und welche somit Amplifikation und Detektion der DNA in einem Assay vereint (Löffler et al., 2000b).

Das größte Problem bei der Anwendung molekularbiologischer Techniken auf die Detektion von Pilz-DNA besteht in der Freisetzung der Nukleinsäuren aus den Organismen, da deren Zellwände sich aufgrund der Bestandteile Chitin und Mannan als sehr lysisresistent erwiesen haben. Enzymatische Aufspaltungen durch Zymolyase / Lyticase oder additive chemische und physikalische Extraktionsmethoden sind daher von verschiedenen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Erfolgen eingesetzt worden (Cenis, 1992, Löffler, 1997, Sandhu et al., 1995).

1.5 Therapie

Eine möglichst frühzeitige Diagnosestellung ist für die erfolgreiche Therapie ausschlaggebend, da bei zu hoher Pilzlast und Progredienz der Infektion die Prognose des Patienten trotz Therapie extrem schlecht ist. Erstes Ziel muss also sein, diagnostische Methoden zu verwenden, die sensitiv genug sind, die Erreger im Blut in so geringer Anzahl detektieren zu können, dass ein Ansprechen auf antimykotische Therapie noch erfolgen kann. Dies bedeutet meist, dass die Diagnose zu einem Zeitpunkt gestellt werden muss, zu welchem noch keine klinischen Zeichen der Infektion vorhanden sind. Aus diesen Punkten wird ersichtlich, dass die Entwicklung extrem sensitiver und schnell durchführbarer Testverfahren die Basis für eine erfolgreiche Therapie darstellt.

Den etablierten „Gold-Standard“ in der first-line Therapie invasiver Aspergillosen stellt das makrozyklische Polyen-Antimykotikum Amphotericin B dar. Aufgrund seiner Wirksamkeit gegen ein breites Spektrum von Erregern fungaler Infektionen, einschließlich Aspergillus- und Candida-Spezies, die über 90 % der Infektionen

hämatologischer Patienten verursachen, und selten auftretender Resistenzentwicklungen wird es bevorzugt eingesetzt.

Sein Wirkungsspektrum schließt auch seltenere Erreger wie *Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* und einige Mucorales-Arten ein. Nachteile des Amphotericin B bestehen einerseits in der niedrigen „Responder“-Rate von zirka 50 % und zum anderen in den häufig auftretenden Nebenwirkungen, insbesondere der Nephrotoxizität (Denning, 1998, Latgé, 1999). Zur Reduktion der Nebenwirkungen werden in den letzten Jahren vermehrt anstelle des konventionellen Desoxycholats liposomale Zubereitungen von Amphotericin B eingesetzt. Die Einbettung des Wirkstoffs in Phospholipid-Doppelmembranen vermindert die Interaktion mit körpereigenen Zellen und scheint daher die Nephrotoxizität zu mildern. Ein zusätzlicher Vorteil der liposomal aufbereiteten Amphotericin B Präparate ist die gesteigerte Gewebegängigkeit (Hebart et al., 1999, Walsh et al., 1999).

Itraconazol, ein Triazol mit breitem antifungalen Wirkspektrum, wird bei non-responding auf Amphotericin B eingesetzt, oder primär bei Patienten, die oral Medikamente einnehmen können, da eine intravenöse Applikationsform nicht verfügbar ist. Bei gleichzeitiger Einnahme von Cytochrom p-450 induzierende Wirkstoffen ist die first-pass Elimination zu hoch, um ausreichende Konzentrationen zu erreichen. Außerdem sind bereits vereinzelt Itraconazol-resistente *Aspergillus*-Stämme aufgetreten (Denning, 1998), wohingegen keine Resistenzen gegen Amphotericin B beschrieben sind.

Weitere neue Breitspektrum-Azole, die in der experimentellen Therapie invasiver Mykosen erste Erfolge zeigen, sind Posaconazol und Voriconazol.

Fluconazol kann gegen *Candida*-Infektionen eingesetzt werden, jedoch sind *C. glabrata* und *C. krusei* intrinsisch resistent gegen diesen Wirkstoff, weitere Resistenzentwicklungen sind z.B. bei *C. tropicalis* zu beobachten. Der Wirkstoff wird jedoch in der Infektionsprophylaxe bei gefährdeten Patienten verwendet.

Flucytosin wird intrazellulär zu Fluorouracil prozessiert und stört die fungale Proteinsynthese. Da die Entwicklung sekundärer Resistenzen gegen den Wirkstoff sehr

schnell auftritt, wird er praktisch nur in Kombination mit Amphotericin B eingesetzt, eignet sich aber aufgrund seiner guten Gewebegängigkeit zur Therapie zentralnervöser Pilzinfektionen.

Neue Wirkstoffe stellen möglicherweise zukünftige Optionen in der antifungalen Therapie dar: Echino- und Pneumocandine (z.B. Caspofungin), Nikkomycin, Pradimicin und Sordaricin.

Additiv kommen Granulozytentransfusionen oder rekombinante Zytokine wie IFN γ , G-CSF und GM-CSF zum Einsatz, um die neutropenische Phase zu verkürzen und die Funktion von Granulozyten und Makrophagen zu verbessern, denen in der Immunantwort gegen Pilzpathogene eine entscheidende Rolle zukommt (Brummer et al., 2002, Hebart et al., 1999). Des Weiteren könnten innovative Therapien wie die adoptive Immuntherapie künftig die Behandlungsmöglichkeiten invasiver Mykosen ergänzen.

Eine chirurgische Therapie mit Resektion lokalisierter Befunde ist insbesondere indiziert bei zentral liegenden Lungenherden, die das Risiko der Arrosion großer Blutgefäße mit konsekutiven fatalen Blutungen bergen. In solchen Fällen wird auch bei eingeschränkter Operabilität des Patienten chirurgisch interveniert (Denning, 1998).

1.6 MagNA Pure LC™ Instrument

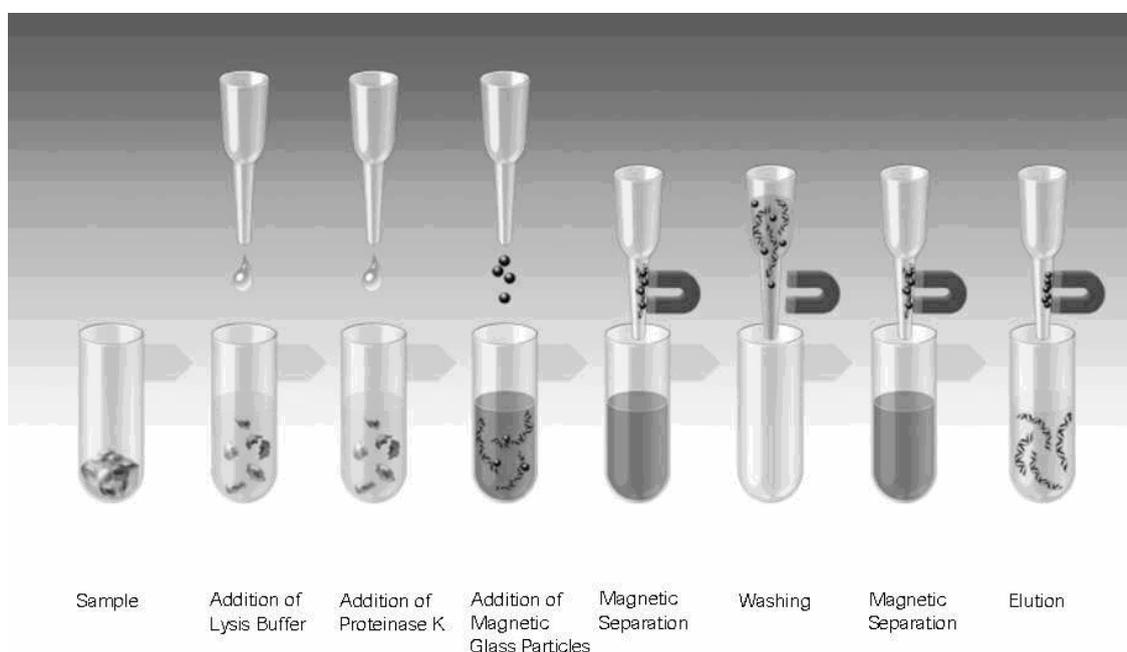
Der Extraktionsautomat MagNA Pure LC™ von Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland ist ein vollautomatischer Roboter zur Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren. Die Gewinnung von DNA, RNA und mRNA ist aus verschiedenen klinischen Materialien wie Blut, Plasma, Serum, kultivierten Zellen, bronchoalveolärer Lavage und Liquor möglich, wobei durch zusätzliche externe Lyseschritte auch speziellere Applikationen (Nukleinsäureaufreinigung aus Gewebe oder Biopsiematerial) durchgeführt werden können.

Das Extraktionsprinzip beruht auf der selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an magnetische Glaspartikel, siehe Abbildung 1. Sämtliche Lysis- und Aufreinigungsschritte werden computergesteuert vom Automaten durchgeführt, so dass

in sehr kurzer Zeit (< 60 min für 32 Proben in einem Durchgang) und ohne manuelle Schritte wie Zentrifugation oder Einsatz von Vakuumpumpen qualitativ hochwertige DNA / RNA gewonnen werden kann (Lapopin & Kirchgesser, 2000).

Kontamination der isolierten Nukleinsäuren aus der Umgebung oder zwischen einzelnen Proben stellt ein großes Problem für die nachfolgende Analyse durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) dar. Der gesamte Isolationsprozess läuft in einem abgeschlossenen Kompartiment ab und die eluierten Nukleinsäure kann direkt in verschiedene gekühlte PCR-Gefäße überführt werden, wodurch das Kontaminationsrisiko erheblich reduziert wird.

Abbildung 1: Extraktionsprinzip von MagNA Pure LC™



Aufreinigung durch selektive DNA-Adhäsion an magnetische Glaspartikel

1.7 Zielsetzung

Der Zeitpunkt der Diagnosestellung ist von immenser Bedeutung für die Behandlung des Patienten mit invasiver Mykose, da nur bei frühzeitiger Initiation der adäquaten Therapie eine günstige Prognose besteht.

Mit Hilfe PCR-basierter Nachweisverfahren ist es heute möglich, schnelle und spezifische Diagnosen zu stellen, wobei auch hier der Zeitaufwand für die Teilbereiche

DNA-Extraktion, Amplifikation und Detektion teilweise erheblich ist. Für die Amplifikation und Detektion gibt es bereits automatisierte hochempfindliche Methoden (COBAS[®] AMPLICOR[®], LightCycler[™], NASBA[™]), die Probenvorbereitung und Nukleinsäureextraktion muss aber immer noch manuell durchgeführt werden und stellt insbesondere im Falle der Pilz PCR den arbeits- und zeitintensivsten Teil einer kompletten PCR-Analyse dar.

Dieser Arbeitsschritt, welcher auch bei einer schnellen real-time PCR-Analyse mit dem LightCycler, den zeit- und fehlerintensivsten Anteil der Diagnostik darstellt, soll mit der MagNA Pure LC[™] Technik automatisiert und standardisiert werden. Durch Kombination beider Technologien ist es dann möglich, innerhalb eines Tages quantitative Testergebnisse zu generieren.

Ziel dieser Arbeit war somit, MagNA Pure LC[™] als Extraktionsautomaten für die Elution von fungalen Nukleinsäuren einzusetzen. Außerdem sollten, ohne Verlust der Sensitivität und Spezifität manueller etablierter Methoden, neue Techniken entwickelt werden, um alle als humanpathogen bekannten Pilze durch einen komplett automatisierten Assay reproduzierbar nachweisen zu können.

Die Anwendbarkeit automatisierter Extraktionsverfahren auf humanpathogene Pilze, besonders im Hinblick auf die Etablierung neuer Techniken zur Aufspaltung der fungalen Zellwände unter Modifikation der Roche Kits für MagNA Pure LC[™] stellte das erste Ziel der vorliegenden Arbeit dar.

Der Vergleich manueller und automatischer Aufreinigung, sowie die Etablierung und Evaluierung der Methode anhand von verschiedenen klinischen Probenmaterialien unter Erhalt der Sensitivität und Spezifität des bereits etablierten Verfahrens (PCR-ELISA) waren das nächste Ziel.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Pilzkulturen

Kulturen der folgenden Pilzstämme wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (Braunschweig) bezogen:

Schimmelpilze

<i>Aspergillus fumigatus</i>	DSM 790
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 737
<i>Aspergillus versicolor</i>	DSM 1943
<i>Aspergillus terreus</i>	DSM 826
<i>Paecilomyces variotii</i>	DSM 1961
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	DSM 1218
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	DSM 70851
<i>Absidia corymbifera</i>	DSM 1144
<i>Fusarium solani</i>	DSM 1164
<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM 905
<i>Acremonium chrysogenum</i>	DSM 880
<i>Penicillium brevicompactum</i>	DSM 3825
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSM 844
<i>Alternaria alternata</i>	DSM 1102

Hefepilze

<i>Candida albicans</i>	DSM 1665
<i>Candida krusei</i>	DSM 70065
<i>Candida inconspicua</i>	DSM 70631
<i>Candida lusitaniae</i>	DSM 70102
<i>Candida glabrata</i>	DSM 70614
<i>Hansenula anomala</i>	DSM 70255
<i>Rhodotorula pilimanae</i>	DSM 70825
<i>Trichosporon cutaneum</i>	DSM 70698

Candida dublinensis wurde aus Probenmaterial eines Empfängers eines allogenen Knochenmarktransplants isoliert (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Tübingen).

Die Pilzstämme wurden auf Sabouraud-Glucose Agar für 48 h (*Candida* spp.), bzw. 72 h (*Aspergillus* spp.) bei 30 °C subkultiviert und anschließend Suspensionen der Pilzzellen (Hefepilze) bzw. Konidien (Schimmelpilze) mit steriler 0,9 % NaCl-Lösung hergestellt.

2.1.1 Herstellung von Verdünnungsreihen

Zur Sensitivitätsbestimmung wurden mit Hilfe photometrischer Bestimmung des Mc Farland Indexes (Mc Farland $A_{530} = 0,5$ entspricht $1 - 5 \times 10^6$ Zellen) Pilzzellsuspensionen definierter Konzentration hergestellt. Von diesen Stammsuspensionen ausgehend wurden Verdünnungsreihen von *Aspergillus*konidien, bzw. *Candida*zellen mit steriler 0,9 % NaCl-Lösung hergestellt ($10^1 - 10^6$ Konidien, bzw. Zellen pro ml).

Blutproben gesunder Probanden wurden mit diesen Verdünnungsreihen inokuliert, um mit bekannter Erregerzahl „infizierte“ Blutproben zu erhalten und so klinische Proben zu imitieren.

2.2 Kontaminationsmonitoring

Bei allen DNA Extraktionen, manuell wie automatisiert, wurden als Negativkontrollen jeweils sterilfiltriertes Injektionswasser, der verwendete Erythrozytenlysispuffer (RCLB, siehe 2.3.2., Tabelle 3) und EDTA-antikoaguliertes Blut gesunder Probanden mitgeführt.

2.3 Manuelle DNA-Extraktion

2.3.1 Extraktion aus Pilzkulturen

Aus den hergestellten Verdünnungsreihen wurde jeweils ein Milliliter Zellsuspension entnommen, bei 2500 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das resuspendierte Pellet wurde für 45 min bei 65 °C in 1 ml „White Cell Lysis Buffer“ (WCLB) inkubiert. WCLB enthält Proteinase K, ein Enzym, welches die Leukozytenlyse durch Spaltung der Peptidbindungen der Zellmembran einleitet.

Tabelle 1: Zusammensetzung des „White Cell Lysis Buffer“ (WCLB)

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Konzentration</u>
Tris-Puffer, pH 7,6	10 mM
EDTA	10 mM
Natriumchlorid	50 mM
Natriumdodecylsulfat	0,2 %
Proteinase K	200 µl / ml

Lagerung bei -20 °C

Nach Ablauf dieses Proteinverdau erfolgte eine Zentrifugation bei 2000 g für 10 min, und das entstandene Pellet wurde resuspendiert und in 500 µl rekombinanter Lyticase aufgenommen. Dieses Enzym spaltet β -1,3-Glucan-Verbindungen der fungalen Zellwände und bewirkt die Ausbildung sogenannter „Sphaeroblasten“, also runde, angeschwollene Pilzzellen. Es wird in rekombinanter Form eingesetzt, um Kontaminationen mit DNA anderer Pilzspezies (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*) auszuschließen (Löffler et al., 1999).

Tabelle 2: Zusammensetzung des Lyticase-Puffers

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Konzentration</u>
Tris-Puffer, pH 7,5	50 mM
EDTA	1 mM
β -Mercaptoethanol	0,2 %
rekombinante Lyticase	1 U / 100 µl

Nach Sterilfiltration Lagerung bei -20 °C

Die Pilzzellwandlyse wurde nach Inkubation der Proben bei 37 °C für 45 min durch Zentrifugation für 10 min bei 2500 g komplettiert und die DNA-Extraktion mit dem QIAmpTissue Kit fortgeführt.

2.3.2 Extraktion aus inokulierten EDTA-Blutproben

Wird DNA zur Amplifikation mittels PCR aus Blutproben gewonnen, so muss initial eine Lyse der Erythrozyten stattfinden, um eine spätere Inhibition der PCR durch

Hämoglobin zu vermeiden. Die Erythrozytenlyse wurde durch Inkubation der Blutproben mit einem hypotonen Puffer, „Red Cell Lysis Buffer“ (RCLB) induziert. Das EDTA-antikoagulierte Blut wurde hierzu mit der vier- bis fünffachen Menge an RCLB aufgefüllt und 10 min bei Raumtemperatur auf einer Horizontalwippe vermischt.

Tabelle 3: 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

Nach Autoklavieren Lagerung bei +4 °C

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine Zentrifugation bei 1500 g für 10 min, der Überstand wurde dekantiert und das verbliebene Pellet aus Leukozyten, fungalen Zellen und Erythrozytendetritus resuspendiert. Diese Schritte wurden zur Komplettierung der Erythrozytenlyse wiederholt und das nach der zweiten Zentrifugation entstandene resuspendierte Pellet in 1 ml WCLB aufgenommen. Die weitere DNA-Extraktion wurde durchgeführt wie unter 2.3.1. beschrieben.

2.3.3 DNA-Extraktion aus Gewebe

Gewebeproben und Biopsate wurden mit sterilen Skalpellens bis auf eine Größe von zirka 1 mm³ zerkleinert und 24 Stunden in 1-3 ml WCLB bei 65 °C inkubiert, um die Gewebestruktur aufzulösen und die Proben der weiteren Extraktionsmethode wie unter 2.3.1. beschrieben zuzuführen.

2.3.4 DNA-Extraktion aus bronchoalveolärer Lavage

Die zu untersuchenden bronchoalveolären Lavagen wurden für 10 min bei 13000 g abzentrifugiert, um sicherzustellen, dass die wenigen enthaltenen Zellen komplett der Extraktion zugeführt werden. Das entstandene resuspendierte Pellet wurde behandelt wie unter 2.3.1. angeführt.

2.3.5 QIAamp DNA Tissue Kit

Sämtliche verwendeten Puffer und Materialien zur DNA Aufreinigung wurden vom Hersteller des QIAamp Tissue Kits geliefert. Das Prinzip der DNA Isolation beruht hier auf deren selektiver Bindung an Silika-Membranen, welche in Abhängigkeit von pH-

Wert und der umgebenden Salzkonzentration reversibel ist. Detaillierte Auskünfte über die Inhaltsstoffe und genaue Zusammensetzung der Lösungen waren von der Firma Qiagen nicht erhältlich.

Das nach der Behandlung wie in 2.3.1. beschrieben erhaltene Pellet wurde resuspendiert und in 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K aufgenommen. Nach Inkubation für 20 min bei 56 °C wurde 200 µl AL Puffer zugegeben und die Probe gut durchmischt. Es erfolgte eine 10minütige Inkubation bei 70 °C bevor durch Zugabe von 200 µl absolutem Ethanol die extrahierte DNA ausgefällt wurde. Das gesamte entstandene Probenvolumen wurde mittels Pipette auf die in Säulchen eingespannten Silica-Membranen aufgebracht und diese mit zwei verschiedenen Waschpuffern gespült, bevor die gebundene DNA aus der Membran durch Zugabe eines Elutionspuffers mit hoher Salzkonzentration und einem pH von ca. 8 herausgelöst wurde. Dieser Vorgang wurde zur vollständigen Elution der DNA zweimal durchgeführt.

2.4 Automatisierte DNA-Extraktion

2.4.1 Vorbehandlung der Proben

EDTA-antikoagulierte Blutproben wurden initial wie unter 2.3.2. mit RCLB behandelt, Gewebeproben wie in 2.3.3. inkubiert und Pilzzellsuspensionen (vgl. 2.3.1.), bzw. BAL (vgl. 2.3.4.) zunächst abzentrifugiert.

2.4.1.1 Zelldisruption

Dem entstandenen Pellet wurden ungefähr 0,5 cm³ Glaskügelchen eines Durchmessers von 180 Micron zugefügt. Anschließend erfolgte die mechanische Zellwanddisruption durch intensives vortexen der Probenröhrchen. Die Flüssigkeit wurde von den Glaspartikeln abgesaugt und ein maximales Probenvolumen von 200 µl in das MagNA Pure LC™ „sample cartridge“ überführt.

2.4.1.2 Flüssiger Stickstoff und Hitze

Sowohl bei Anwendung manueller wie bei der automatisierten DNA Extraktion wurden bei Pilzspezies, deren Zellwandaufbau extrem komplex und lysisresistent ist (z.B. *Aspergillus versicolor*, *Rhizopus oryzae*, *Alternaria alternata*) zusätzlich zum enzymatischen Lyticase-Verdau der Zellwände, bzw. deren mechanischer Destruktion

physikalische Methoden eingesetzt. Durch alternierende Inkubation der Pilzzellen in flüssigem Stickstoff (-180 °C) und einem kochenden Wasserbad erfolgte eine zusätzlich unterstützende Aufspaltung der Zellwände. Im Falle der manuellen Extraktion erfolgte dieser Schritt nach der in 2.3.1. beschriebenen WCLB Inkubation und die Proben wurden danach mit Lyticase weiterbehandelt.

Bei Anwendung der automatisierten Technik wurden die Proben, wenn aufgrund der verwendeten Pilzspezies nötig, nach der mechanischen Zellwandlyse unterstützend mit dem beschriebenen Protokoll behandelt.

2.4.2 MagNA Pure LC™

Würde man einfach einen Automaten bauen, der die zur Zeit erhältlichen Kits zur manuellen Nukleinsäureextraktion automatisch abarbeitet, müsste dieser Automat zentrifugieren oder mit Unter- bzw. Überdruck arbeiten können. Dies erfordert einen hohen technischen Aufwand und erhöht sowohl die Fehleranfälligkeit als auch die Kosten. Als Alternative bieten sich magnetische Silicapartikel an, die einen Eisenkern besitzen, auf den Magnetit aufkristallisiert ist. Diese Partikel sind außerdem noch von einer Schicht aus Glasschuppen, die mit einem Sinterungsverfahren aufgebracht werden, umgeben.

Nukleinsäuren haben die Eigenschaft, sich bei hohen Salzkonzentrationen bzw. Ionenstärken an Glas zu binden, insbesondere, wenn die Glasoberfläche porös ist. Mit Hilfe eines Magneten ist es daher möglich, die magnetischen Glaspartikel und somit auch die daran gebundenen Nukleinsäuren aus einer Lösung zu isolieren. Wie bei jeder Nukleinsäureextraktion erfolgt auch bei der MagNA Pure LC™ im ersten Schritt eine Lyse. Mittels Guanidiniumsalzen in hoher Konzentration und Proteinase K werden die Zellhüllen aufgebrochen. Die nun frei zugänglichen Nukleinsäuren werden an die magnetischen Glaspartikel gebunden. Bei Pipettieren dieser Lösung schiebt sich ein am Pipettierarm befindlicher Magnet zu den Spitzen vor und die Partikel samt gebundenen Nukleinsäuren werden in den Spitzen zurückgehalten – auf diesem Weg werden die Partikel von einer Waschlösung zur nächsten transportiert und die an den Partikeln noch anhaftenden Verunreinigungen gewegewaschen. Im letzten Schritt werden die Partikel bei hoher Temperatur in einem Medium mit niedriger Ionenstärke inkubiert, wobei sich die gebundenen Nukleinsäuren von den Partikeln wieder ablösen. Mit Hilfe des

Magneten werden nun noch die Partikel entfernt und man erhält eine Lösung von gereinigten Nukleinsäuren.

Der Nukleinsäureextraktionsautomat MagNA Pure LC™ (Roche Diagnostics, Penzberg) arbeitet nach Programmierung der Software und Bereitstellung der benötigten Reagenzien und sterilen Kunststoffutensilien als vollständig geschlossenes System. Der Extraktionsvorgang kann nicht manuell unterbrochen werden und ein Öffnen des Geräts ist erst nach Beendigung aller Arbeitsschritte möglich, so dass das Risiko einer Kontamination der Proben minimiert ist.

Abbildung 2



- Innenansicht des MagNA Pure LC™ :**
- 1) Pipettierarm**
 - 2) Prolog-Einheit (Proben, Reagenzien, Pipettenspitzen)**
 - 3) Prozessierung der Proben**
 - 4) Nukleinsäureelution und Postelutionseinheit**

Ablauf:

- Start der Software, programmieren des Geräts für die Isolierung und für eine eventuelle Postelution
- Wahl des richtigen Protokolls, Eingabe der Probenliste
- Beladen des Geräts mit den Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Proben
- Start des Isolationsvorgangs
- Entnahme der isolierten Proben oder Durchführung einer Postelution
- Reinigung und Dekontamination des Geräts

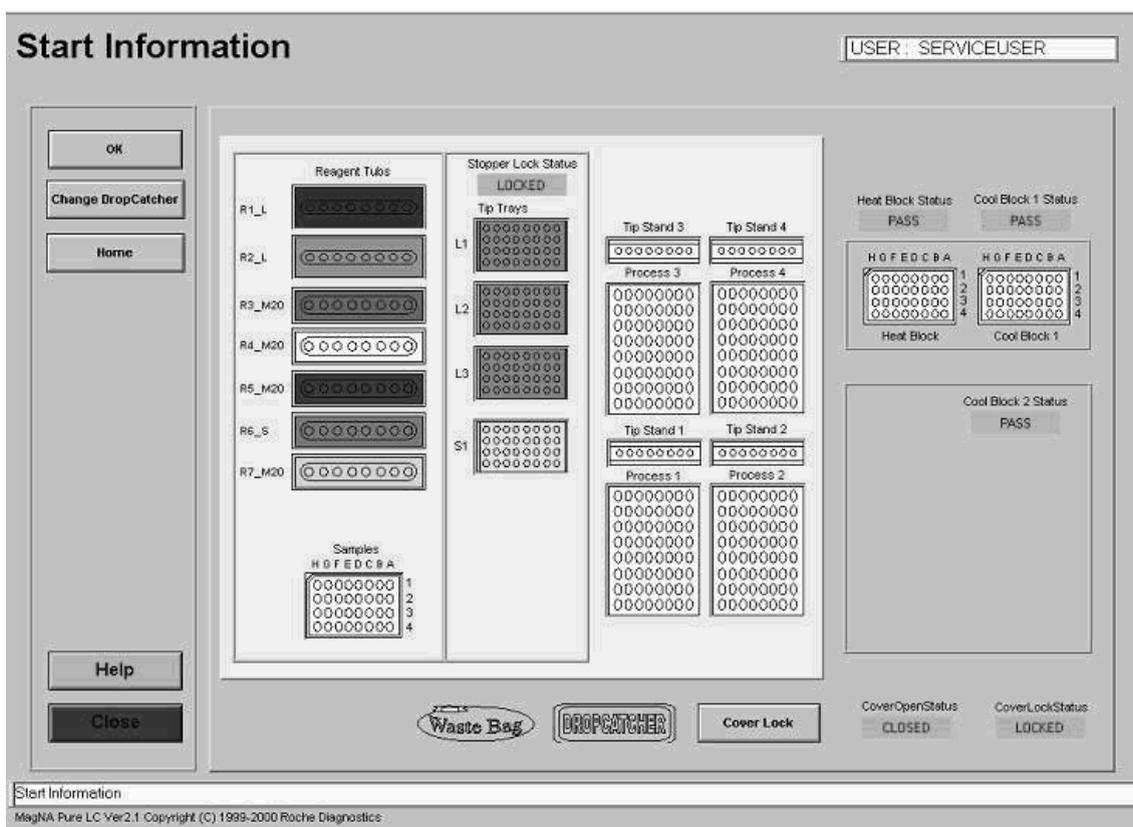
2.4.2.1 Setup der Software

MagNA Pure LC™ ist vom Hersteller mit verschiedenen Software-Protokollen zur automatisierten Extraktion von DNA, RNA, mRNA oder allen in einer Probe enthaltenen Nukleinsäuren ausgestattet. Die Auswahl des jeweils passenden Programms, sowie die Eingabe der Anzahl und des Volumens der zu bearbeitenden Proben und deren Codierung sind die einzigen Schritte, die auf der Benutzeroberfläche der Software eingegeben werden müssen. Sämtliche Arbeitsschritte und Wege, die der Pipettierarm im Gerät benutzt sind damit festgelegt.

2.4.2.2 Vorbereitung des Geräts

Die in „sample cartridges“ enthaltenen Proben des Untersuchungsmaterials, sowie Puffer und benötigte sterile Einmal-Plastikware (Pipettenspitzen, Reagenziencontainer und „processing cartridges“) wurden in die sterile Arbeitsfläche eingesetzt.

Abbildung 3



Startmenü der MagNA Pure LC™ Software

2.4.2.3 Extraktionsprotokolle

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden mit dem „total-NA“ Extraktionskit und Programm durchgeführt. Dieses Aufreinigungsprotokoll ist entwickelt worden, um auch geringe Mengen an Nukleinsäure (DNA und RNA) aus Materialien isolieren zu können, in welchen eine geringe Zellkonzentration erwartet wird. Gegen diese standardmäßig angewandte Methode wurde das Protokoll „High pure DNA“ getestet.

Detaillierte Angaben zu den Inhaltsstoffen der einzelnen Reagenzien waren vom Hersteller nicht zu eruieren.

2.5 Qualitätskontrolle der extrahierten DNA

Eine photometrische Vermessung der zu amplifizierenden DNA war nur nach Extraktion mit dem High Pure DNA-Kit möglich, da die mit dem total-NA Protokoll extrahierten Nukleinsäuren auch RNA beinhalten.

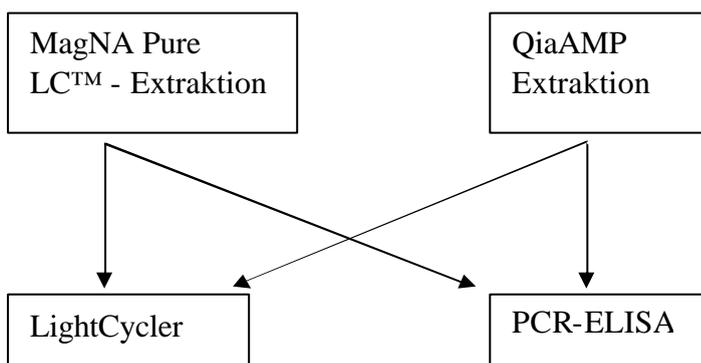
Die Vermessung der im Elutionspuffer gelöst vorliegenden DNA erfolgte an einem Photometer vom Typ LS 500. Es wurden die Extinktionen bei 260 nm (DNA), 280 nm (Proteine) und 320 nm (Löslichkeit) gemessen. Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 nm und 280 nm wurde als Maßstab für die Reinheit der DNA betrachtet, wobei ein Quotient von 1,7 bis 1,9 als ideal angenommen wurde.

2.6 Amplifikations- und Detektionsprotokolle

Die eluierten Nukleinsäuren wurden im „elution-cartridge“ des MagNA Pure LC™ gekühlt aufbewahrt, bis eine manuelle oder ebenfalls automatisierte Weiterbehandlung erfolgte. Wenn die extrahierte DNA mittels konventioneller PCR amplifiziert werden sollte, endeten hier die vom Automaten durchgeführten Arbeitsschritte.

Nach der Etablierung der MagNA Pure LC™ Extraktionsmethode wurde die DNA aus allen Probenmaterialien (Pilzsuspensionen, inokulierte, sowie klinische Blutproben, BAL und Biopsate) zum Vergleich mit der manuellen Methode (Lyticase & QiaAMP Tissue Kit) parallel mittels beider Techniken extrahiert.

Abbildung 4



Schematischer Ablauf des Vergleichs der Extraktions-, Amplifikations- und Detektionsmethoden

Die extrahierten Nukleinsäuren wurden einerseits der Amplifikation in einem konventionellen Thermoblock mit anschließender Detektion durch PCR-ELISA und andererseits der real-time Amplifikation und Detektion mittels LightCycler zugeführt. Dies ermöglichte einen Vergleich der Sensitivität und Spezifität der beiden Nachweisverfahren.

2.6.1 Target-Sequenz der Amplifikationen: 18 ssu rDNA

Die Amplifikationsreaktionen (LightCycler-PCR und konventionelle PCR) wurden mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt, welche komplementär zum 18 ssu rDNA Gen sind. Es handelt sich hierbei um ein multi-copy Gen, welches in einer hochkonservierten Region des fungalen Genoms liegt. Dies bedingt zum einen die hohe Sensitivität der PCR mit 18 ssu rDNA Primern, da in einem Organismus ca. 90 Kopien

des zu amplifizierenden Gens vorliegen. Zum anderen sind die verwendeten Primer universell, d.h. dass eine Vielzahl von Pilzspezies diese Zielregion in ihrem Genom enthalten (Löffler, 1997) und somit amplifiziert werden kann.

Primersequenzen:

Forward-Primer: 5` - ATT ggA ggg CAA gTC Tgg Tg - 3` Tm: 65,5 °C

Reverse-Primer: 5` - CCg ATC CCT AgT Cgg CAT Ag - 3` Tm: 64,5 °C

2.6.2 LightCycler PCR

Für die LightCycler-Amplifikation wurde die isolierte DNA, sowie alle für den PCR-Reaktionsmix benötigten Reagenzien (siehe Tabelle 4) vom MagNA Pure LC™ direkt in gekühlte Reaktionsgefäße (LightCycler-Glaskapillaren) pipettiert. Erst nach diesem Arbeitsschritt erfolgte eine Öffnung des Extraktionsautomaten und die Glaskapillaren wurden manuell verschlossen. Das gesamte Probenkarussell mit den Kapillaren wurden in einer speziellen Zentrifuge kurz bei 110 x g abzentrifugiert, um den Reaktionsansatz in allen Kapillaren in den unteren Teil des Glasgefäßes zu bringen und Luftblasen zu eliminieren. Nach Einsetzen des Probenkarussells in den LightCycler wurde das Amplifikationsprogramm gestartet (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 1: PCR-Reaktionsmix für LightCycler-PCR

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Volumen [µl]</u>	<u>Endkonzentration</u>
LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes	2	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,6	3 mM
Forward Primer (24 µM)	0,25	0,6 µM
Reverse Primer (24 µM)	0,25	0,6 µM
Fluorescein Sonde (30 µM)	1	3 µM
LC-Red-640 Sonde (30 µM)	1	3 µM
H ₂ O (sterilfiltriert)	3,9	
DNA	10	
<u>Gesamtvolumen</u>	20	

Tabelle 2: Temperaturprofil der LightCycler-PCR

<u>Prozess</u>		<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
Initiale Denaturierung		9 min	95 °C
Amplifikation	Denaturierung	1 s	95 °C
	Annealing	15 s	54 °C
	Elongation	25 s	72 °C
		Temperaturerhöhung: 20 °C / s	
<u>Zyklen:</u> 45 (Gesamtdauer: 45 min)			

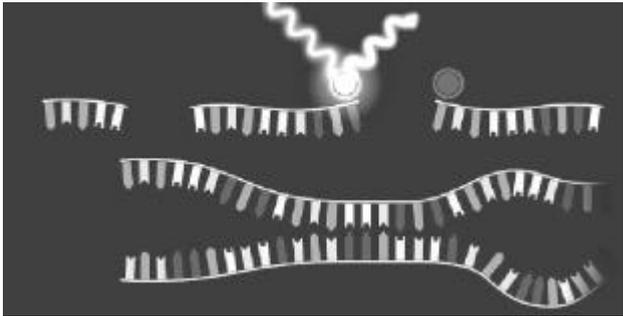
2.6.2.1 LightCycler-Sonden

Die Detektion der Amplifikate erfolgt im LightCycler synchron zur fortschreitenden Amplifikation, kann über die Software verfolgt werden (real-time PCR) und erlaubt gleichzeitig eine Quantifizierung der amplifizierten DNA.

Eine Möglichkeit, eine real-time PCR im LightCycler Format durchzuführen, ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Zwei sequenzspezifische Hybridisierungs sonden, welche innerhalb der amplifizierten Genregion binden, sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, eine am 5'- Ende mit LightCycler Red 640, die andere am 3'- Ende mit Fluoreszein. Binden nun diese Sonden während der Annealing Phase des PCR Zyklus an die Targetsequenz, so befinden sie sich in einem Abstand von einer Base zueinander auf dem DNA Einzelstrang. Nur in dieser Position kann der Energietransfer stattfinden: die 3'- fluoreszeinmarkierte Sonde sendet nach Anregung durch eine interne blaue Lichtquelle grünes Licht einer Wellenlänge von unter 640 nm aus. Dieses Licht regt die 5'- Red 640 markierte Sonde zur Emission von rotem Licht einer Wellenlänge von 640 nm an, welches im Kanal 2 des optischen Systems des LightCycler-Instruments am Ende der Annealing-Phase gemessen wird.

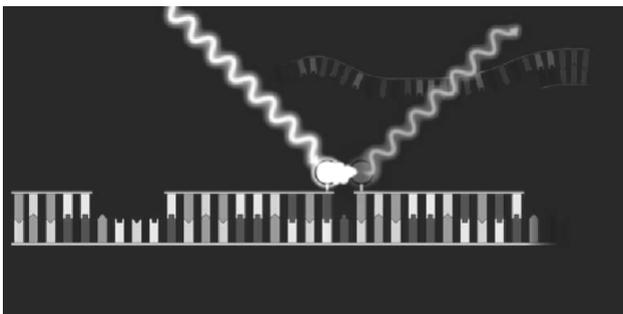
Während der anschließenden Elongation werden die Sonden vom Einzelstrang verdrängt - es entsteht kein Signal. Während der Denaturation in jedem PCR Zyklus findet keine Hybridisierung der Sonden mit dem DNA-Strang statt, so dass auch hier keine Emission detektiert werden kann.

Abbildung 5: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer



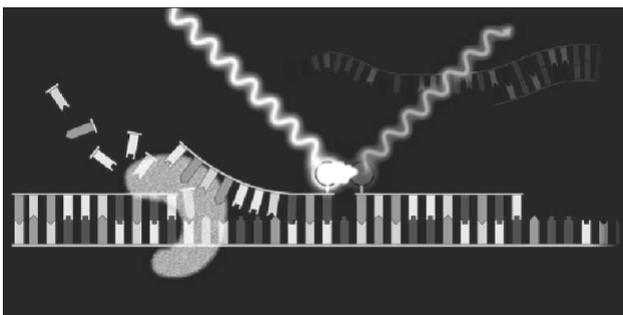
Denaturierung:

Die fluoreszenzmarkierten Sonden binden nicht an die DNA und befinden sich in keiner definierten Nähe zueinander



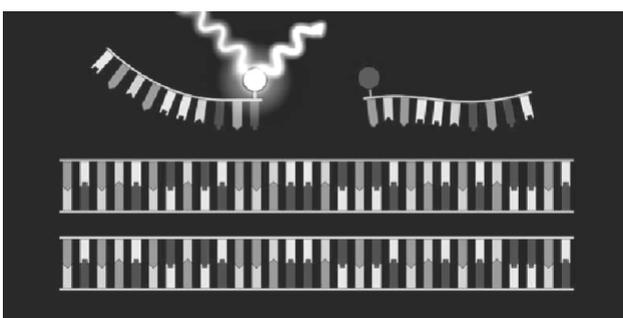
Annealing:

Die Sonden binden im Abstand von einer Base an den DNA-Strang. Der FRET findet statt, eine Lichtemission kann detektiert werden.



Elongation:

Die Sonden werden vom DNA-Einzelstrang verdrängt



Nach Abschluß des PCR-Zyklus liegen die Sonden wieder frei vor

Es wurden folgende Sondenpaare, welche jeweils spezifisch die Gattungen *Aspergillus* spp., bzw. *Candida albicans* detektieren, eingesetzt:

Aspergillus spp.

3`- FL: 5`- gTTCCCCCACA gCCAgTgAAggC-Fluoreszein - 3`

5`- LC: 5`- Red 640 - TgAggTTCCCCAgAAggAAAggTCCAgC - 3`

Candida albicans

3`- FL: 5`- AgCCTTTCCTTCTgggTAgCCATT-Fluoreszein - 3`

5`- LC: 5`- Red 640 - TggCgAACCAggACTTTTACTTTgA - 3`

2.6.2.2 Schmelzkurvenanalyse

Zur Speziesdifferenzierung wurde im Anschluss an die Amplifikationszyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei kann festgestellt werden, ob eines oder mehrere Amplifikationsprodukte in dem Reaktionsansatz entstanden sind, was im verwendeten Format von Bedeutung war, da die eingesetzten Primer (vgl. 2.6.1.) universell sind, also viele Pilzspezies amplifiziert werden können. Die eingesetzten Sonden hybridisieren teilweise mit Amplifikaten, die nicht in jeder Base komplementär sind, schmelzen dann aber vom Amplifikat bereits bei niedrigeren Temperaturen ab. Dies kann durch die Schmelzkurvenanalyse sichtbar gemacht werden.

Die in der Glaskapillare vorliegende doppelsträngige DNA wurde durch stetige Temperaturerhöhung von 50 °C auf 95 °C (Anstieg um 0,2 °C / s) denaturiert. Während dieses Prozesses ist erneut die Hybridisierung der Sonden mit der Einzelstrang DNA möglich und die entstehenden Fluoreszenzsignale werden kontinuierlich gemessen. In der Software-Auswertung konnten nun die unterschiedlichen Schmelzkurven analysiert werden.

2.6.3 Konventionelle PCR

Zum Vergleich der Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit der beiden Amplifikationsmethoden wurden die mit MagNA Pure LC™ oder Qiagen extrahierte DNA aller Probenmaterialien einer etablierten PCR (Löffler et al., 1998) zugeführt.

Die verwendeten Primer entsprachen denen der LightCycler-PCR (vgl. 2.6.1.).

Das Amplifikat wurde während der PCR mit Digoxigenin-desoxyuraciltriphosphat markiert, um eine anschließende Detektion mittels PCR-ELISA zu ermöglichen (vgl. 2.6.4.).

Tabelle 3: 10-fach PCR-Puffer

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

Lagerung bei -20 °C

Tabelle 4: PCR Mix

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Volumen [µl]</u>	<u>Endkonzentration</u>
10-fach PCR-Puffer	27,2	vgl. Tabelle 7
H ₂ O (sterilfiltriert)	5	
MgCl ₂ (25 mM)	2	5 µM
Desoxyadenosintriphosphat (200 µM)	1	200 µM
Desoxyguanosintriphosphat (200 µM)	1	200 µM
Desoxycytidintriphosphat (200 µM)	1	200 µM
Desoxythymidintriphosphat (190 µM)	1	190 µM
Digoxigenin-desoxyuraciltriphosphat (10 µM)	1	10 µM
Forward-Primer (24 µM)	0,25	
Reverse-Primer (24µM)	0,25	
Taq-Polymerase	0,3	
DNA	10	
<u>Gesamtvolumen</u>	50	

Tabelle 5: Temperaturprofil

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

2.6.4 PCR-ELISA

Die Detektion des PCR-Produktes mittels PCR-ELISA wurde durchgeführt wie bereits beschrieben (Löffler, 1997, Löffler et al., 1998).

Dabei wurden die während der PCR mit Digoxigenindesoxyuraciltriphosphat (vgl. 2.6.3.) markierten Amplifikate durch biotinylierte Oligonukleotidsonden nachgewiesen. Nach der PCR erfolgte die Denaturierung, indem 20 µl des Amplifikats mit 20 µl Denaturierungslösung vermischt wurden. Danach wurde die Hybridisierung durchgeführt, indem je 200 µl Hybridisierungslösung, die die biotinylierten Oligonukleotide in einer Konzentration von 7,5 pM / ml enthält, zugefügt wurden. Anschließend wurden 200 µl aus diesem Gesamtvolumen in eine Mikrotiterplatte überführt, deren Böden mit Streptavidin beschichtet sind. Parallel wurden interne Kontrollreaktionen mit digoxigeninmarkierter humaner DNA mitgeführt. Die Kontroll-DNA wurde in Verdünnungen von 1:1, 1:10 und 1:100 vorgelegt und mit einer biotinmarkierten spezifischen Kontrollsonde nachgewiesen.

Die Mikrotiterplatte wurde anschließend für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Es folgten drei Waschungen der Mikrotiterplatte mit Waschlösung, bevor den Proben je 200 µl Anti-Digoxigenin-Antikörperlösung (Fab-Fragmente konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, 2,5 mU / ml) zugegeben wurde.

Eine weitere Inkubation für 30 min bei 37 °C schloss sich an.

Die Mikrotiterplatte wurde erneut sechsmal mit Waschlösung gereinigt und im Anschluss wurden jeder Probe 200 µl 2,2 Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-Lösung

(Substrat) zugefügt. Dadurch wurde die Farbentwicklung eingeleitet. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C konnte die Farbintensität in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm und mit einem Referenzfilter von 492 nm vermessen werden.

2.6.5 Gelelektrophorese

PCR-Amplifikationsprodukte können in einem Agarosegel durch Anlegen einer elektrischen Spannung ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit im Anschluss an beide verwendeten PCR-Protokolle (vgl. 2.6.2. und 2.6.3.) zum unspezifischen Nachweis von Amplifikationsprodukten eingesetzt.

Es wurden 10 µl Amplifikationsprodukt mit 2,5 µl 5 x Laufpuffer versetzt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des 5 x Laufpuffers

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

Das gesamte Probenvolumen von 12,5 µl wurde in die Taschen eines auspolymerisierten zweiprozentigen Agarosegels, hergestellt mit 2 g Agarose und 100 ml 1 x TAE-Puffer, pipettiert.

Dem Agarosegel wurden in noch flüssigem Zustand 5 µl Gelstar zugefügt, welches DNA-interkalierende Eigenschaften besitzt und durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt wird.

Tabelle 7: Zusammensetzung des 1 x TAE-Puffers

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Konzentration</u>
Tris, pH 7,5	2 M
Essigsäure, 96%	2 M
EDTA	0,1 M

Zur Auftrennung der Amplifikate wurde Gleichstrom mit einer Spannung von 70 – 100 V und 85 – 125 mA für 90 – 120 min angelegt.

Eine Auswertung sowie dokumentierende Fotografie des Gels fand anschließend unter UV-Licht (312 nm) statt.

2.7 Sequenzierung

Um zu untersuchen, ob die von MagNA Pure LC TM extrahierte DNA geeignet ist, um eine anschließende DNA-Sequenzierung durchzuführen, wurden einzelne Proben mir initial nicht näher bezeichneter Pilzspezies extrahiert und einer Sequenzierungs-PCR zugeführt. Es handelte sich um Proben, welche im Rahmen eines Ringversuchs verschiedenen Laboratorien zur Identifizierung übergeben wurden. Die Ergebnisse wurden anschließend unter den verschiedenen Instituten verglichen.

Die gesamten Sequenzierungsversuche wurden durchgeführt, wie bereits beschrieben (Löffler, 1997).

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick Purification Kit nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt.

30 ng DNA wurden in das Cycle Sequencing eingesetzt, dazu wurden 8 µl Terminator Ready Reaction Mix, 3,2 pM Primer und 8 µl Ampuwa pipettiert.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Terminator Ready Reaction Mix

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Konzentration</u>
TACS-Puffer	5 x *
DyeDeoxy A	15 µM
DyeDeoxy T	900 µM
DyeDeoxy G	4 µM
DyeDeoxy C	450 µM
AmpliTaq-Polymerase	4 U

* genaue Zusammensetzung von der Firma Perkin Elmer nicht erhältlich

Die PCR wurde unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils für 25 Zyklen durchgeführt:

Tabelle 9: Temperaturprofil

<u>Prozess</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
Denaturierung	10 s	96 °C
Annealing	5 s	56 °C
Elongation	4 min	60 °C

Danach wurden die Proben mit Hilfe von CentriSep-Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die eigentliche Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Kun im Tropenmedizinischen Institut durchgeführt.

2.8 Patienten

Nach Etablierung der Extraktion fungaler DNA durch MagNA Pure LC™, und nachdem deren Reproduzierbarkeit, Spezifität und Sensitivität mit Hilfe von Pilzsuspensionen und mit Pilzzellen oder –konidien inokulierten Blutproben betrachtet worden war, wurden klinische Blut- und BAL-Proben mit der neuen Methode untersucht. Die Proben stammten von Patienten, welche sich parallel in einer klinischen

Studie befanden, die eine empirische Therapie invasiver Pilzinfektionen mit der PCR-basierten Initiation antimykotischer Therapie vergleicht.

Ergebnisse dieser Studie sind noch nicht verfügbar. Es handelt sich um eine prospektive, randomisierte klinische Studie, die Patienten nach allogener Knochenmark- oder peripherer Blutstammzelltransplantation einschließt. Die Patienten erhalten entweder eine präemptive antimykotische Therapie bei positivem Pilznachweis durch PCR oder empirische Therapie bei klinischem Verdacht auf eine Pilzinfektion. In beiden Gruppen wird zur Behandlung eine liposomale Formulation von Amphotericin B (Ambisome®) eingesetzt.

Es wurde, da für die Extraktion mittels MagNA Pure LC™ nur relativ geringe Blutmengen eingesetzt werden können (vgl. 2.4.1.1.), eine Ausgangsmenge von 500 µl EDTA-antikoaguliertes Blut verwendet und behandelt wie beschrieben. Wenn bei den beschriebenen Patienten aus diagnostischen Gründen eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt wurde, so wurde auch daraus ein geringes Volumen entnommen und untersucht.

Insgesamt wurden 57 Blutproben und 11 BALs von 31 Patienten untersucht und die Ergebnisse mit denen der Studien-PCR (die durchgeführt wurde wie in 2.6.3. und 2.6.4. beschrieben) verglichen.

Die Patienten, bei welchen nicht korrelierende Testergebnisse auftraten, wurden durch die Auswertung ihrer klinischen Daten und anhand weiterer Untersuchungsergebnisse analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Modifikationen der etablierten DNA-Extraktion

Initial wurde versucht, das etablierte Verfahren zur DNA-Extraktion (siehe 2.3.) möglichst wenig abzuändern, da die hiermit erzielten Ergebnisse, insbesondere in Hinblick auf die benötigte Sensitivität zum Screening klinischer Proben, optimal sind.

Ziel war jedoch, den Assay zu automatisieren und den erforderlichen personellen und zeitlichen Aufwand zu reduzieren. Daher wurden unterschiedliche Teile des etablierten Protokolls modifiziert.

3.1.1 Parallele Lyse von Erythrozyten und Leukozyten

Es wurde versucht, die Arbeitsschritte der Erythrozytenlyse (siehe 2.3.2.) und der Leukozytenlyse (siehe 2.3.1.) zusammenzuführen. Dazu wurde ein „red cell lysis buffer“ (Roche) verwendet, welcher in konzentrierter Form vorliegt. Statt 40 ml RCLB (Universitätsapotheke) mußten nur 2 ml Puffer (Roche) je Probe (3 ml EDTA-Blut, inokuliert mit *Aspergillus fumigatus* Konidien in definierten Konzentrationen) eingesetzt werden. Somit war es möglich, die Inkubation des RCLB mit der des WCLB (1 ml) zu kombinieren und so die Gesamtdauer des Assays um ca. eine Stunde zu verkürzen.

Die Kombination dieser beider Lysisschritte erwies sich jedoch als ineffektiv, da weder ein vollständiges Auswaschen des Hämoglobins, noch eine befriedigende Zelllyse erreicht wurde. Die Proben wiesen eine hohe Viskosität auf und waren braun verfärbt. Die Silica-Membranen einiger QiaAmp Extraktionssäulchen verstopften durch die Probe.

Die extrahierte DNA wurde amplifiziert (siehe 2.6.3.) und die PCR-Produkte mittels PCR-ELISA detektiert (siehe 2.6.4.).

Alle mit dieser Methode extrahierten Proben verblieben im PCR-ELISA negativ, d.h. es konnte keine DNA amplifiziert werden (siehe Tabellen 10 und 11).

3.1.2 Vorgesalteter DNase-Verdau

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Menge an humaner DNA in den mit MagNA Pure LC™ zu extrahierenden Blutproben zu reduzieren. Die DNA-bindenden Glaspartikel sind bei einer DNA-Menge von 7 µg je Probe gesättigt; bei höherem DNA-

Gehalt der Proben kommt es zu einer Klumpenbildung der Glaskügelchen und die Extraktion wird ineffektiv. Um möglichst selektiv in der Lage zu sein, fungale DNA zu extrahieren, sollte vor der Extraktion mit MagNA Pure LC™ die DNA aus Blutzellen eliminiert werden.

Dazu wurden die Proben (3 ml EDTA-Blut, inokuliert mit *Aspergillus fumigatus* Konidien in definierten Konzentrationen) mit DNase (Roche) vorinkubiert und anschließend gemäß dem konventionellen Extraktionsprotokoll behandelt. Es sollte gezeigt werden, ob die DNase in die Pilzzellen eindringen kann und die Ausbeute an fungaler DNA einschränkt. Wiederum wurde eine PCR mit anschließendem PCR-ELISA durchgeführt.

Im PCR-ELISA zeigte sich, daß die Vorbehandlung der Proben mit DNase zu einem Sensitivitätsverlust führt. Die untere Detektionsgrenze lag mit 10^3 CFU / ml zu hoch. Aus den Proben, die 10^2 und 10^1 CFU enthalten hatten, konnte keine DNA amplifiziert werden (Tab. 10 und 11).

Tabelle 10: ELISA-Ausdruck der Ergebnisse von Versuch 3.1.1. und 3.1.2.

	1	2	3	4
A	9,999	9,999	0,068	0,060
B	2,294	1,416	0,066	0,057
C	2,052	0,432	0,077	0,007
D	1,528	0,189	0,063	0,007
E	1,067	0,154	1,750	0,007
F	0,252	1,980	0,572	0,007
G	0,077	0,067	0,113	0,008
H	2,249	0,075	0,041	0,008

Messfilter: 492 nm, Referenzfilter: 630 nm

Erklärung zum ELISA-Ausdruck:

Tabelle 11: Auswertung des ELISA-Ausdrucks

1A	Positiv (10^5 CFU/ml)	<p><i>EDTA-Blut, inokuliert mit Aspergillus fumigatus Konidien ($10^5 - 10^0$ Konidien pro ml), manuelle DNA-Extraktion nach etabliertem Protokoll (wie beschrieben in 2.3.)</i></p>
1B	Positiv (10^4 CFU/ml)	
1C	Positiv (10^3 CFU/ml)	
1D	Positiv (10^2 CFU/ml)	
1E	Positiv (10^1 CFU/ml)	
1F	Positiv (10^0 CFU/ml)	
1G	Negativ (Negativkontrolle = RCLB)	
1H	Positiv (10^6 CFU/ml)	<p><i>EDTA-Blut, inokuliert mit A. fumigatus Konidien ($10^6 - 10^1$ CFU je ml), Vorinkubation mit DNase</i></p>
2A	Positiv (10^5 CFU/ml)	
2B	Positiv (10^4 CFU/ml)	
2C	Positiv (10^3 CFU/ml)	
2D	Negativ (10^2 CFU/ml)	
2E	Negativ (10^1 CFU/ml)	
2F	Positiv (Positivkontrolle)	<p><i>A. fumigatus Konidien suspension, 10^3 CFU/ml, manuelle etablierte DNA-Extraktion wie in 2.3.</i></p>
2G	Negativ (10^5 CFU/ml)	<p><i>EDTA-Blut, inokuliert mit Aspergillus fumigatus Konidien (10^4 und 10^3 CFU/ml: Silicamembran verstopft, Probe unbrauchbar), RCLB & WCLB bei der Extraktion kombiniert</i></p>
2H	Negativ (10^2 CFU/ml)	
3A	Negativ (10^1 CFU/ml)	
3B	Negativ (10^0 CFU/ml)	
3C	Negativ (Negativkontrolle = RCLB)	
3D	Negativ (aqua bidest.)	<p><i>Negativkontrolle</i></p>
3E	Positiv (human-DNA 1:1)	<p><i>interne ELISA Kontroll-Reaktion mit digoxigeninmarkierter humaner Kontroll-DNA (Roche), die durch eine spezifische biotinmarkierte Kontrollsonde detektiert wird.</i></p>
3F	Positiv (human-DNA 1:10)	
3G	Negativ (human-DNA 1:100)	

3H	Negativ (aqua bidest.)	<i>Negativkontrolle</i>
4A	Negativ (Negativkontrolle)	<i>Hybridisierungslösungen (für A. fumigatus, bzw. Human-DNA)</i>
4B	Negativ (Negativkontrolle)	
4C	Keine Probe	
4D	Keine Probe	
4E	Keine Probe	
4F	Keine Probe	
4G	Keine Probe	
4H	Keine Probe	

3.1.3 Lyticase und MagNA Pure LC TM

Es erfolgten Versuche mit externem Lyticase-Verdau wie im etablierten Assay (siehe 2.3.) und anschließender Anwendung von MagNA Pure LC TM.

Hierbei wurden Konidiensuspensionen und inokulierte Blutproben (Blutvolumina 3 ml, 1 ml, 500 µl und 100 µl) eingesetzt.

DNA aus Verdünnungsreihen von *A. fumigatus* Konidien ließ sich mit dieser Technik in befriedigender Weise extrahieren, die untere Detektionsgrenze lag bei 10¹ CFU.

Bei der DNA-Extraktion aus mit Konidien beimpften Blutproben wurde das Zell-Pellet nach Lyticase-Verdau in den von MagNA Pure LC TM verwendeten Lysispuffer aufgenommen. Dabei kam es bei eingesetzten Blutvolumina von über 500 µl zu einer sofortigen Ausbildung hochvisköser Klumpen, die Proben konnten teilweise nicht weiter verwendet werden. Auch bei den extrahierbaren Proben (100 und 500 µl Blut) lag das untere Detektionslimit mit 10² CFU zu hoch.

Aufgrund dieser mangelnden Sensitivität und dem noch hohen manuellen Aufwand der Extraktion wurde nach alternativen Möglichkeiten zur Zellaufspaltung gesucht.

3.2 Zelldisruption durch Glaspartikel

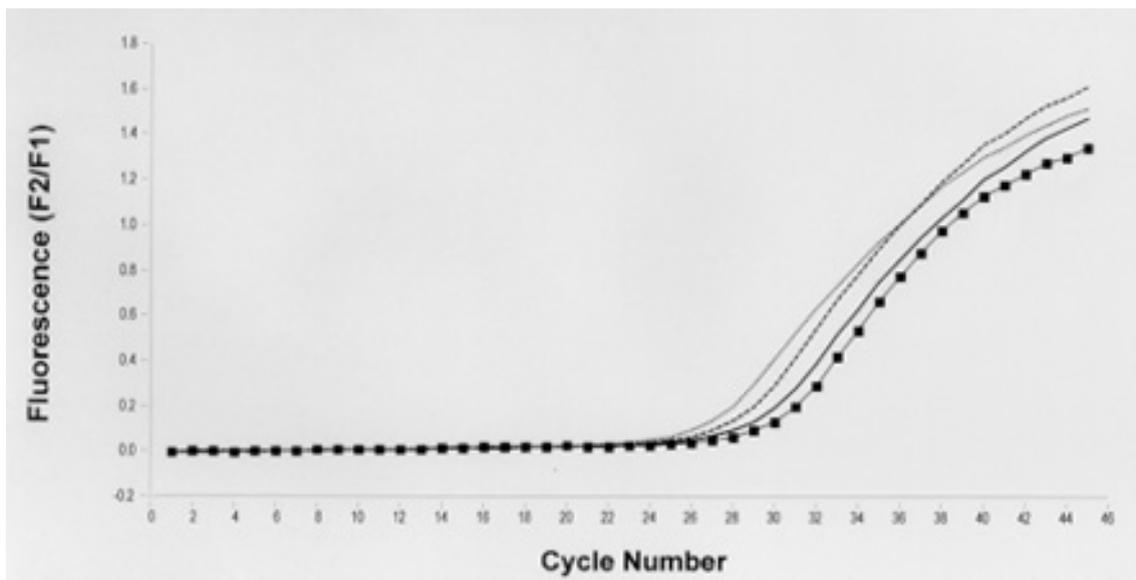
Als Alternative zur enzymatischen Zellwandlyse mittels WCLB und Lyticase wurde versucht, ein mechanisches Verfahren zur Disruption fungaler Zellen / Konidien zu entwickeln. Dafür wurden Glaskügelchen eines Durchmessers von 180 Mikron den

Proben (im Falle von Blut dem nach der Erythrozytenlyse entstandenen Pellet) zugesetzt und die Reaktionsgefäße intensiv gevortext.

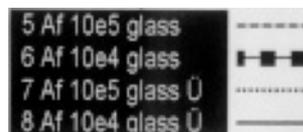
Als erster Versuch wurde danach die Probenflüssigkeit abgesaugt und abzentrifugiert und das entstandene Pellet in den von MagNA Pure LC™ verwendeten Lysispuffer aufgenommen. Die so extrahierte DNA wurde durch LightCycler-PCR amplifiziert und detektiert. Es konnten befriedigende Resultate im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität erzielt werden; die Detektionsgrenze lag bei 10^1 CFU.

In einem weiteren Versuch wurde nach der Zelldisruption durch Glaspartikel die abzentrifugierte Probe in Überstand und Pellet getrennt und beides einer LightCycler-PCR zugeführt. Es konnte in Überstand und Pellet ungefähr äquivalente DNA-Mengen amplifiziert und detektiert werden (Abb. 6).

Abbildung 6: Analyse von Überstand und Pellet nach Zelldisruption mit Glaskügelchen



Legende:



Erläuterung: Proben 5 und 6 = Pellet, Proben 7 und 8 = Überstand

Diese Resultate ermöglichten eine weitere Reduktion der Arbeitsschritte, indem die abgesaugte Probenflüssigkeit nicht mehr zentrifugiert wurde, sondern direkt nach dem vortexen in das MagNA Pure LC™ „sample cartridge“ überführt werden konnte. DNA,

die auf diese Weise extrahiert worden war, wurde im LightCycler amplifiziert und detektiert. Die untere Grenze der Detektion lag bei 10^1 CFU.

3.2.1 Sensitivität

Verdünnungsreihen

Die in 3.2. beschriebene DNA-Extraktion mit MagNA Pure LC TM, gefolgt von der DNA-Amplifikation und quantitativen Detektion mittels LightCycler, wurde für Verdünnungsreihen von Aspergillus fumigatus Konidiensuspensionen (10^6 - 10^0 Konidien = CFU / ml) und Candida albicans Zellsuspensionen (10^6 - 10^0 Zellen = CFU / ml) auf ihre Sensitivität hin getestet.

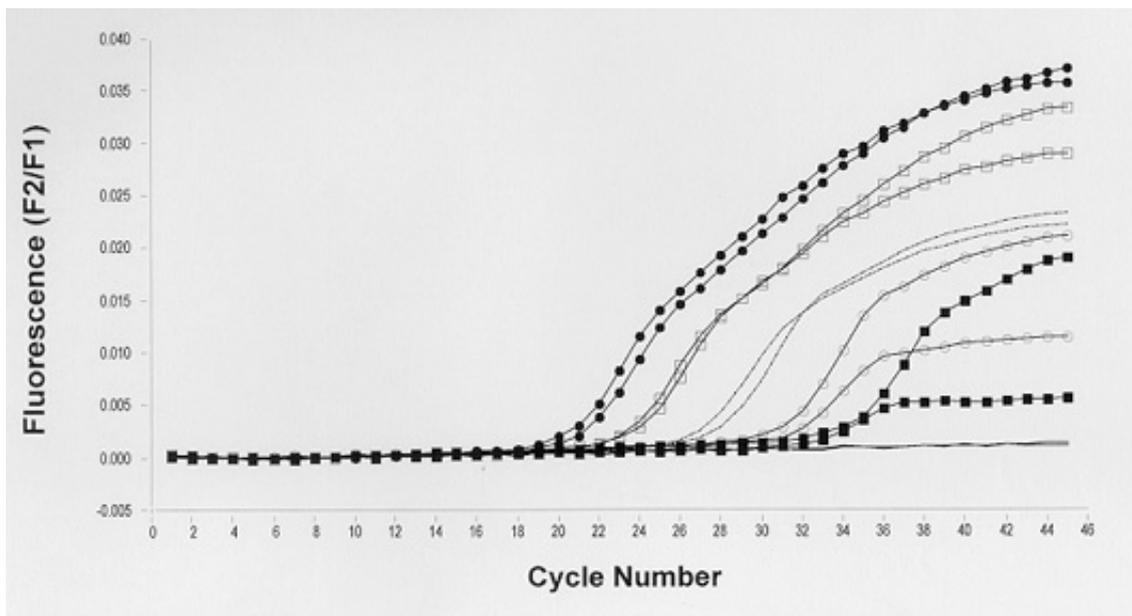
Eine untere Detektionsgrenze von 10^1 CFU, wie sie mit dem etablierten Verfahren (manuelle Qiagen DNA-Extraktion, konventionelle PCR und PCR-ELISA) für beide Pilzspezies erreicht wird, galt als notwendiges Ziel der neuen Methodik.

Tabelle 12: Detektionsgrenzen bei MagNA Pure LC TM -Extraktion und LightCycler-Detektion

<u>Spezies</u>	<u>Versuche gesamt</u>	<u>10^1 CFU detektiert</u>	<u>10^0 CFU detektiert</u>
Aspergillus fumigatus	28	28	9
Candida albicans	4	4	4

Damit konnte mit MagNA Pure LC TM extrahierter Pilz-DNA die Sensitivität des Routine-Verfahrens für die Detektion von Aspergillus fumigatus Konidien erhalten, und für Candida albicans Zellen sogar verbessert werden.

Abbildung 7: Verdünnungsreihe Candida albicans



Legende:

1 Candida albicans 10e0	■-■-■
2 C. albicans 10e0	■-■-■
3 C. albicans 10e1	○-○-○
4 C. albicans 10e1	○-○-○
5 C. albicans 10e2	○-○-○
6 C. albicans 10e2	○-○-○
7 C. albicans 10e3	□-□-□
8 C. albicans 10e3	□-□-□
9 C. albicans 10e4	●-●-●
10 C. albicans 10e4	●-●-●
11 Aspergillus fumigatus	—
12 ddH ₂ O	—

Erläuterung: Doppelbestimmung serieller Verdünnungsschritte von 10^0 – 10^4 CFU pro ml, negativ verbleiben Aqua bidest (Probe 12) und A. fumigatus (Probe 11)

Zur Sensitivität der MagNA Pure LC™ Extraktion von seriell verdünnten A. fumigatus Konidiensuspensionen siehe Abb. 11 (in 3.5.).

Blutproben

Das initial eingesetzte Blutvolumen erwies sich als limitierender Faktor für die MagNA Pure LC™ Extraktion. Von der etablierten Methode ausgehend und vor dem Hintergrund, dass die „Pilzlast“ im Blut von Patienten sehr niedrig ist (1 – 10 CFU / ml), wurde initial versucht, ein Blutvolumen von 3 ml einzusetzen. Aus diesen Proben konnte keine fungale DNA extrahiert werden.

Bei einem Ausgangsvolumen von 1 ml Blut lag die untere Detektionsgrenze bei 10^2 CFU.

Die mit 10^1 CFU / ml inokulierten Blutproben waren erst bei Reduktion des Initialvolumens auf 500 μ l detektierbar.

Ein weiteres Problem stellte das Volumen des Pellets nach Erythrozytenlyse dar. Bei Verwendung von Blutproben > 500 μ l konnte nicht das gesamte Pellet nach der glass bead Disruption in MagNA Pure LC TM eingesetzt werden. Das maximale Volumen, welches in das „sample cartridge“ überführt werden kann, beträgt 200 μ l. Dies wurde bei größeren Blutmengen überschritten, so dass die Proben nur anteilig extrahiert werden konnten.

3.3 MagNA Pure LC TM Protokolle

Nachdem mit den Glaskügelchen eine neue Möglichkeit zur Aufspaltung der Zellwände gefunden worden war, wurden die MagNA Pure LC TM Extraktionskits „Total NA Isolation, Protocol Total NA Serum, Plasma, Blood“ und „DNA Isolation, Protocol DNA I Blood Cells High Performance“ gegeneinander ausgetestet. Kriterien waren wiederum die erreichbare Detektionsgrenze, sowie die Gesamtdauer des Verfahrens.

Tabelle 13: Vergleich der MagNA Pure LC TM Kits

<u>Methode</u>	<u>Dauer *</u>	<u>Detektionslimit</u>
Total NA	90 min	10^1 CFU
High Performance DNA	92 min	10^1 CFU

* für 32 Proben

Aufgrund dieser Resultate wurde die Extraktion in den folgenden Versuchen mit dem „Total NA“ Kit durchgeführt.

3.4 DNA-Extraktion aus verschiedenen Pilzspezies mit MagNA Pure LC

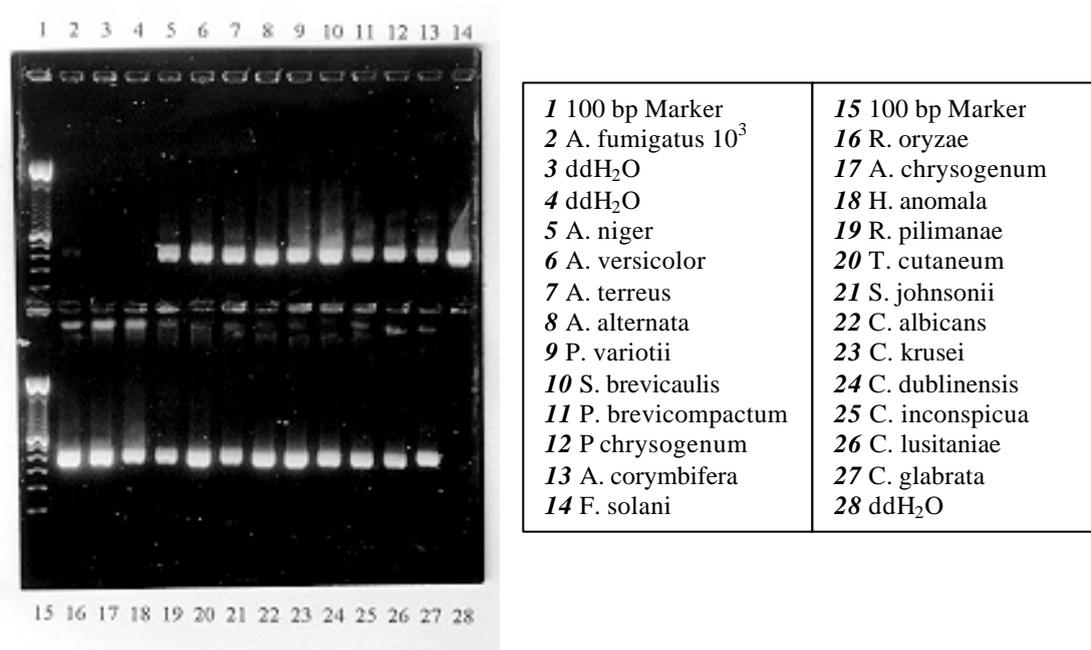
DNA aus folgenden Pilzen konnte mit dem entwickelten Protokoll und MagNA Pure LC TM erfolgreich extrahiert werden:

Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus versicolor, Aspergillus terreus, Paecilomyces variotii, Scopulariopsis brevicaulis, Sporidiobolus johnsonii, Absidia corymbifera, Fusarium solani, Rhizopus oryzae, Acremonium chrysogenum, Penicillium brevicompactum, Penicillium chrysogenum, Alternaria alternata, Candida

albicans, Candida krusei, Candida inconspicua, Candida dublinensis, Candida lusitaniae, Candida glabrata, Hansenula anomala, Rhodotorula pilimanae, Trichosporon cutaneum.

Die mit MagNA Pure LC™ extrahierte Pilz-DNA wurde mittels LightCycler-PCR amplifiziert und durch Gelelektrophorese nachgewiesen (Abb. 8).

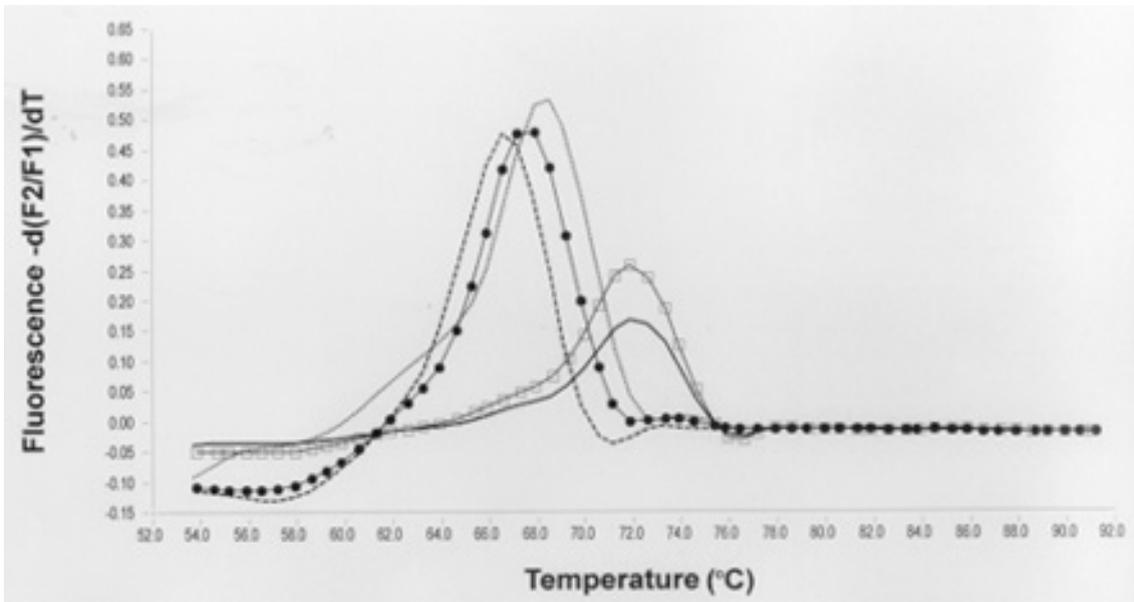
Abbildung 8: Gelelektrophorese aller mit MagNA Pure LC™ extrahierten Pilze



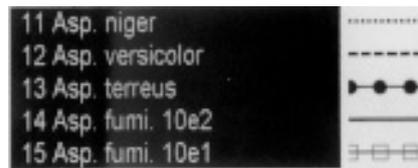
3.5 Spezifität

Die verwendeten LightCycler Sonden detektierten nicht ausschließlich *Aspergillus fumigatus*, bzw. *Candida albicans* DNA. MagNA Pure LC™-extrahierte DNA aus den o.g. Pilzen wurde mittels LightCycler PCR unter Verwendung der *A. fumigatus* und *C. albicans* Sonden amplifiziert und die detektierbaren Proben durch die Schmelzkurvenanalyse ausgewertet.

Abbildung 9: Schmelzkurvenanalyse verschiedener Aspergillus Spezies (Detektion mit *A. fumigatus* Sonde im LightCycler)



Legende:

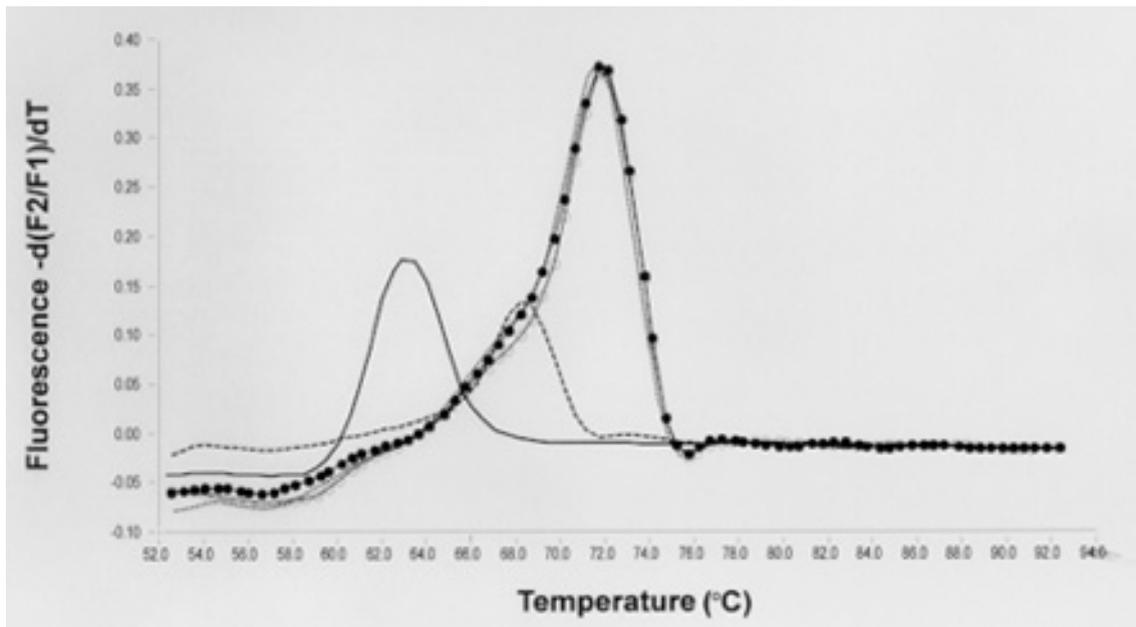


Die verwendete LightCycler Sonde detektiert außer *A. fumigatus* noch folgende der extrahierten *Aspergillus* Spezies:

- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus versicolor*
- *Aspergillus terreus*

Die Temperatur, bei welcher die Sonden von der amplifizierten DNA „abschmelzen“ liegen jedoch umso niedriger, je weniger Basen zwischen Oligonukleotid und Amplifikat komplementär sind.

Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse verschiedener Schimmelpilze



Legende:

2 <i>Paecilomyces variotii</i>	—
3 <i>Scopulariopsis b.</i>	—
4 <i>Penicillium brevicompactum</i>	—○—○—○—
5 <i>Penicillium chrysogenum</i>	—●—●—●—
6 <i>Curvularia inaequalis</i>	—
7 <i>Absidia c.</i>	- - - - -
8 <i>Fusarium sp.</i>	—
9 <i>Rhizopus oryzae</i>	—
10 <i>Acremonium chrysogenum</i>	—
11 <i>Aspergillus fumigatus</i> 10e5

Dabei konnte bestätigt werden, daß die *A. fumigatus* Sonden keine Hefepilze detektieren und die *C. albicans* Sonden nicht mit Schimmelpilzen hybridisieren.

Es konnte gezeigt werden, daß mit MagNA Pure LC™ eine spezifische Extraktion fungaler DNA so rein möglich war, daß eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden konnte.

Das *Aspergillus* Sondenpaar hybridisiert auch mit DNA folgender Schimmelpilze:

- *Penicillium brevicompactum*
- *Penicillium chrysogenum*
- *Absidia corymbifera*
- *Paecilomyces variotii*

Die Temperatur, bei der das Sonden-Oligonukleotid von den spezifischen Amplifikaten von *Penicillium brevicompactum* und *P. chrysogenum* abschmilzt, ist dieselbe wie für *A. fumigatus*. Penicillien spielen jedoch in Europa klinisch keine Rolle.

Für das *Candida albicans* Sondenpaar konnte keine Hybridisierung mit DNA der anderen extrahierten Hefepilze detektiert werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits gezeigten Eigenschaften der LightCycler Sonden und zeigen deren Übertragbarkeit auf maschinell extrahierte DNA.

3.6 Kontaminationskontrolle

Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Evaluierung der neu entwickelten Extraktionstechnik war die Frequenz von Kontaminationen. Da insbesondere Aspergillen ubiquitär und somit in der Raumluft vorkommen, ist eine Kontamination der Proben prinzipiell leicht möglich. Auch eine Übertragung von Pilzzellen zwischen einzelnen Proben während der Bearbeitung muß vermieden werden, um reliable Testresultate zu erhalten.

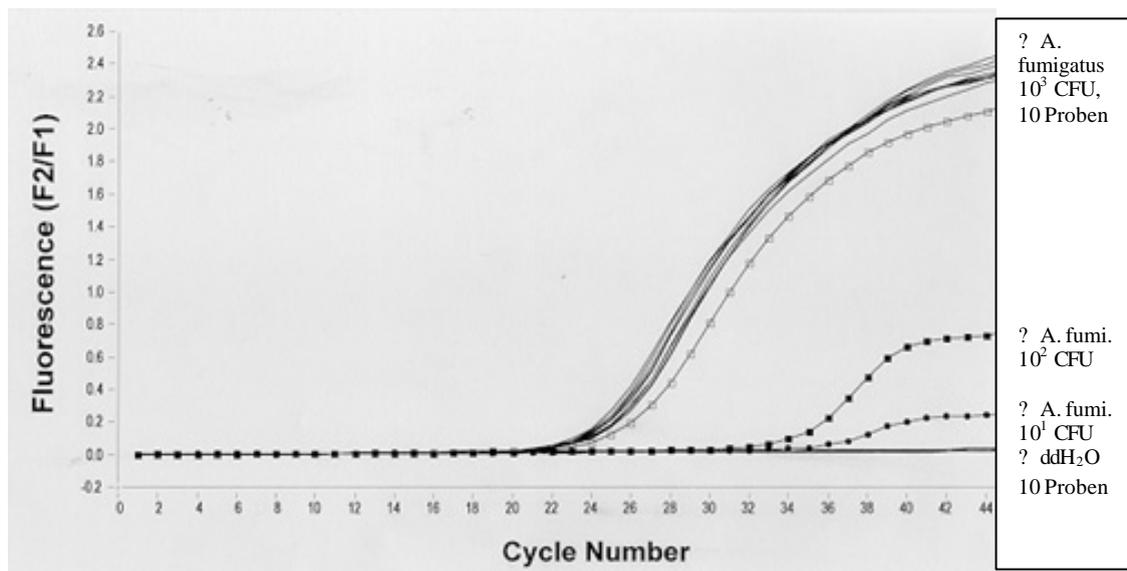
Bei allen durchgeführten Extraktionen wurden Negativkontrollen in Form von Nativblut gesunder Spender, RCLB oder Aqua bidest. mitgeführt (eine Negativkontrolle je zehn Proben). In die Amplifikationen wurde zusätzlich das jeweils für den PCR-Mix verwendete Wasser eingesetzt, um dessen Reinheit zu überprüfen.

In keiner der mitgeführten Negativkontrollen (n = 43) konnte durch LightCycler Analyse oder Gelelektrophorese Pilz-DNA nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde ein Experiment durchgeführt, um zu prüfen, ob es zu einer Übertragung von Probenflüssigkeit oder DNA zwischen den einzelnen Gefäßen innerhalb des MagNA Pure LC™ Gerätes kommen kann. Hierzu wurde in das „sample cartridge“ alternierend sterilfiltriertes Wasser und *Aspergillus* Konidien suspension pipettiert und die Extraktion durchgeführt. Der Abstand zwischen den einzelnen Probengefäßen im „sample cartridge“ beträgt ca. 0,1 cm.

Auch hier konnte in den Wasserproben keine fungale DNA amplifiziert und detektiert werden (Abb. 11).

Abbildung 11: LightCycler-Ausdruck



Aus der Abbildung ist zusätzlich die Sensitivität der MagNA Pure LC™ Extraktion von seriell verdünnten *A. fumigatus* Konidiensuspensionen ersichtlich. Die untere Detektionsgrenze liegt bei 10^1 CFU/ml.

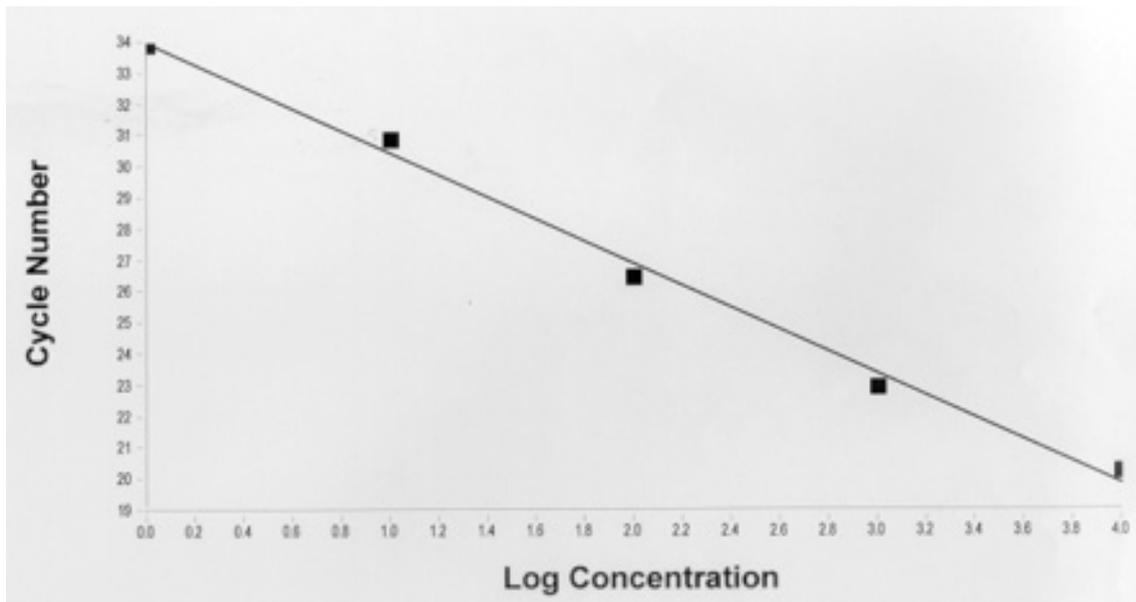
3.7 Quantifizierung der MagNA Pure LC™ extrahierten DNA

Während man durch den PCR-ELISA nur relative Positivergebnisse erhält, ist die LightCycler Technik in der Lage, quantitative Testresultate zu liefern. Aus der Menge des Amplifikates kann auf die in der Probe vorgelegene Ausgangsmenge an DNA geschlossen werden.

Die Linearität und Reproduzierbarkeit des durchgeführten Assays können über diese Quantifizierung beurteilt werden.

MagNA Pure LC™ -extrahierte DNA ließ sich über ein Spektrum von 10^1 – 10^5 CFU linear amplifizieren und detektieren.

Abbildung 12: Regressionsgerade



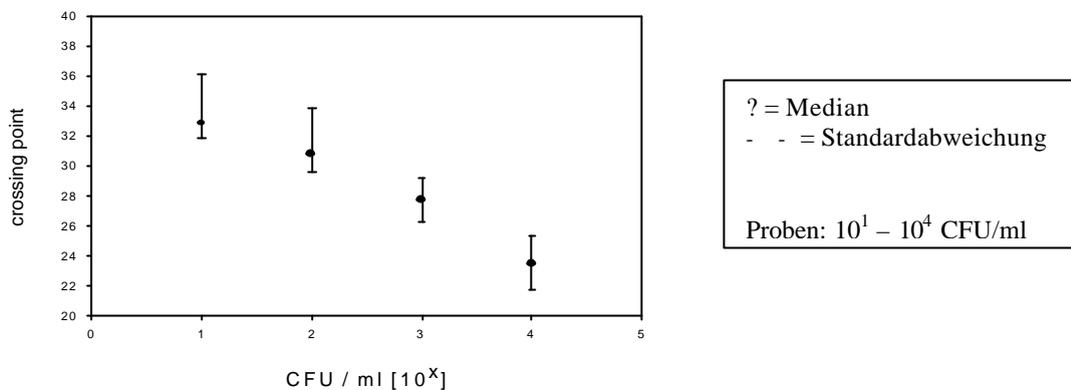
! = “crossing point”: Zyklus, an welchem das Fluoreszenzsignal der Probe sich signifikant von der Nulllinie abhebt.

Proben: *C. albicans*, $10^0 - 10^4$ CFU/ml

3.7.1 Reproduzierbarkeit

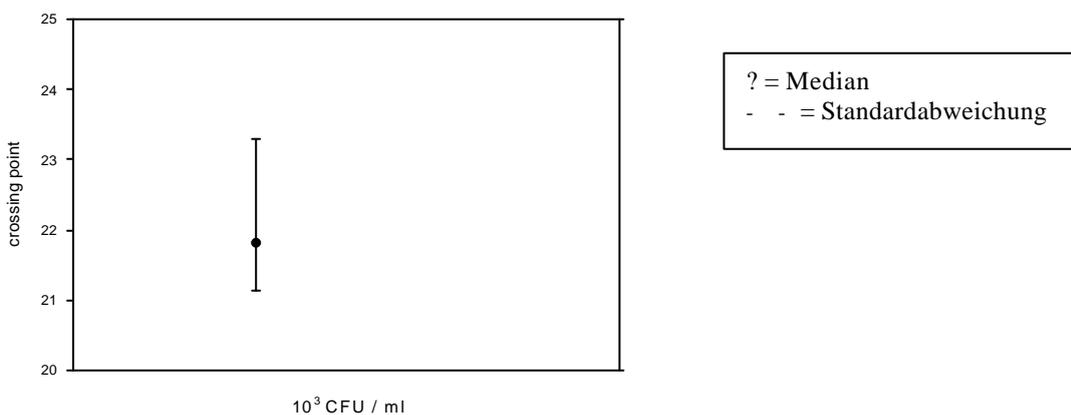
Die sogenannten „crossing points“, d.h. die Zeitpunkte, an denen eine Probe im Verlauf der PCR positiv wird, also der sie repräsentierende Graph die Nulllinie kreuzt, können zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit des Tests herangezogen werden. Die Zahlenwerte der crossing points für jeweils gleiche Verdünnungsstufen an DNA sollten in den durchgeführten Läufen vergleichbar sein.

Diagramm 1: Extraktion einer Verdünnungsreihe (A. fumigatus) zu 5 verschiedenen Zeitpunkten



10^1 CFU: arithmet. Mittel = 34,02, Standardabweichung = 2,17
 10^2 CFU: arithmet. Mittel = 31,75, Standardabweichung = 2,19
 10^3 CFU: arithmet. Mittel = 27,74, Standardabweichung = 1,47
 10^4 CFU: arithmet. Mittel = 23,49, Standardabweichung = 1,82

Diagramm 2: LightCycler Amplifikation und Detektion derselben Positivkontrolle (Probe = A. fumigatus, 10^3 CFU/ml, MagNA Pure LC™ extrahiert) in 16 verschiedenen Läufen



Arithmet Mittel = 22,20, Standardabweichung = 1,07

3.8 Sequenzierung

Die mit MagNA Pure LC TM und dem beschriebenen Protokoll extrahierte fungale DNA von einer Qualität, die es ermöglichte, eine Sequenzierung der DNA durchzuführen.

3.9 Analyse von Patientenproben

Zur Evaluierung des entwickelten Extraktionsverfahrens mit MagNA Pure LC wurden insgesamt 68 klinische Proben (57 EDTA-Blutproben und 11 BALs) von 31 hämatologischen Patienten analysiert. Die Ergebnisse wurden mit den Testresultaten der Routine-PCR (siehe 2.3.) derselben Proben verglichen.

In 63 Fällen korrelierten die Ergebnisse beider Assays miteinander: In 62 / 63 Proben konnte keine Pilz-DNA nachgewiesen werden, eine Proben zeigte in beiden Tests positive Werte für *A. fumigatus* DNA.

In fünf Fällen (Patienteninitialen in Klammern) zeigten die beiden Testmethoden unterschiedliche Ergebnisse:

- 2 BAL-Proben von 2 Patienten (B.M., P.S.) waren im Routine Test (Qiagen & PCR-ELISA) positiv für *Aspergillus fumigatus* DNA
- eine BAL war positiv für *Candida albicans* DNA (M.B.)
- eine Blutprobe positiv für *Aspergillus fumigatus* DNA (S.G.)
- eine Blutprobe positiv für *Candida albicans* DNA (A.J.)

Aus diesen fünf Proben ist mit MagNA Pure LC TM jeweils keine Pilz-DNA extrahiert worden.

Aus diesem Grund wurden die klinischen Daten der betreffenden Patienten ausgewertet (siehe Tabelle 14).

3.10 Vergleich mit klinischen Daten

Tabelle 14

<u>Patient</u>	<u>Grunderkrankung & deren Therapie</u>	<u>Behandlung (Medikation)</u>	<u>Klinik</u>	<u>Diagnostik</u>
B.M., ?, *1964 Kiel	Lungentransplantation 03.'00, Chron. Abstossung seit 2001	Antimykot. Prophylaxe seit TX & Immunsuppression wg. Abstossung	Keine invasive Mykose (schriftl. Auskunft vom 15.06.'01)	<i>Lungenbiopsie & Blut</i> (20.04.'01 & 25.06.'01. Asp-), <i>BAL</i> 20.04 Asp+ Qia, 25.06 Asp-, <i>Thorax-CT</i> : kein Anhalt auf inv. Aspergillose
P.S., ?, *1946 Tübingen	AML bei MDS, allogene KMT 05.'00, Z.n. pulmonaler Aspergillose	Resektion li. Lungenflügel 09.'00, Ambisome & Voriconazol	Keine Beschwerden	<i>Thorax CT</i> : progrediente pulm. Infiltration, <i>BAL</i> 03.05.'01 Cand+ Qia molekularpathologischer Nachweis von RSV in dieser BAL
M.B., ?, *1978 Oldenburg	CML, allogene KMT 08.'00	Keine Angaben	03.'01 subfebrile Temp. & Dyspnoe	<i>Thorax-CT</i> : V.a. atyp. Pneumonie, <i>BAL</i> 30.03.'01 Cand+ Qia Pneumocystis carinii - Nachweis, Remission auf Cotrimoxazol (mdl. Auskunft 14.06.'01)

S.G., ?, *1969 Tübingen	AML allogene KMT 01.'01, GvHD der Haut	Steroide wg. GvHD	Aufnahme wg. V.a. Infektion: häorrhagische Zystitis	<i>Blut</i> 26.04.'01 Asp+ Qia kein Nachweis von Asp.-Ag od. -Ak Remission auf Cotrimoxazol
A.J., ?, *1992 Kiel	ALL, allogene KMT 11.'00	Itraconazol seit KMT	Kein V.a. Infektion (mdl. Auskunft vom 15.06.'01)	Wöchentl. <i>Blut</i> kontrollen 11.'00 – 06.'01, immer neg. auf Cand. & Asp. Ausnahme: 03.05.'01 Cand+ Qia

Abkürzungen:

AML: akute myeloische Leukämie

MDS: Myelodysplastisches Syndrom

CLL: chronische lymphatische Leukämie

ALL: akut lymphatische Leukämie

Z.n.: Zustand nach

KMT: Knochenmarktransplantation

BAL: bronchoalveoläre Lavage

MSU: Mittelstrahlurin

GvHD: Graft-versus-Host-Disease

V.a.: Verdacht auf

TX: Transplantation

Qia: Qiagen-Extraktion & PCR-ELISA

CT: Computertomographie

Asp+/-, bzw. Cand+/-: positives/negatives Testergebnis für Asp. fumigatus, bzw. Cand. albicans

RSV: respiratory syncytial virus

4 Diskussion

Die Entwicklung der Medizin in den vergangenen Jahren stellt Ärzte und Wissenschaftler vor neue Herausforderungen im Bereich der Infektiologie. Eine steigende Anzahl immunsupprimierter Patienten ist von opportunistischen Infektionen betroffen, welche die rasche Initiation einer adäquaten Therapie erfordern. In der Transplantationsmedizin, in Onkologie, Hämatologie und bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen werden immer mehr teilweise intensive Immunsuppressionen induziert. Pilzinfektionen betreffen insbesondere dieses Patientenkollektiv, ebenso wie chirurgische Patienten, Frühgeborene, Patienten auf Intensivstationen und HIV-Infizierte.

Sowohl Frequenz als auch das Erregerspektrum der beobachteten invasiven Mykosen steigt in den letzten Jahren beständig an. Das Auftreten bisher unbekannter oder als unbedeutend angesehener Erreger erschwert die klinische Diagnostik ebenso wie die Therapie und entscheidet über die Prognose des Patienten.

Bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien, protrahierter Neutropenie nach Knochenmark- oder Stammzelltransplantation und bei Anwendung intensiver Chemotherapieprotokolle stellen Pilzinfektionen ein gravierendes Problem für die Behandlung dar.

Tritt bei Patienten in der neutropenischen Phase nach einer myelosuppressiven Therapie Fieber auf, so wird ohne Therapie die Mortalität dieser Patienten mit 70 - 90 % angegeben. Von Maschmeyer et al. (1994) wurde beobachtet, dass ein Ansprechen auf antimikrobielle Therapie bei Anwendung von bakteriziden Breitspektrum-Antibiotika allein eine Remissionsrate von 27 % zu verzeichnen war. Kombiniert mit antimykotischen Wirkstoffen sprachen 67 % der behandelten Patienten auf die Therapie an. Dies belegt, dass unspezifische klinische Symptome bei vielen Patienten aus Hochrisiko Kollektiven auf eine Pilzinfektion zurückzuführen sind.

Am Beispiel invasiver Candida-Infektionen lässt sich feststellen, dass nicht mehr *Candida albicans*, sondern Infektionen mit non-*albicans* Spezies dominieren; beispielsweise ist *Candida krusei* inzwischen für bis zu 10 % der Candida-Infektionen bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation verantwortlich (Einsele, 2002).

Auch die Inzidenz von Infektionen mit Schimmelpilzen, insbesondere mit Aspergillus Arten nimmt in den letzten Jahren weiter zu. Als Erreger wird dabei in 90 % der Fälle Aspergillus fumigatus isoliert. Die Gruppe von Wald et al. (1997) beschreibt in einer großen retrospektiven Studie ein Ansteigen der Inzidenz der invasiven Aspergillose von 5,7 % im Jahre 1987 auf 11,2 % 1993.

Die frühe Diagnose von Pilzinfektionen wird dadurch erschwert, dass die klinische Symptomatik unspezifisch ist, und sensitive Testverfahren nicht standardisiert sind. Zudem manifestieren sich klinische Symptome meist erst zu einem Zeitpunkt, an welchem die Infektion bereits ein fortgeschrittenes Stadium erreicht hat.

Durch die Anfertigung von hochauflösenden Computertomographien des Thorax, wie sie insbesondere in den USA regelmäßig zur Diagnostik einer pulmonalen Aspergillose eingesetzt werden, konnte die Zeitspanne bis zur Diagnosestellung im Durchschnitt von sieben auf 1,9 Tage reduziert werden (Caillot et al. 1997). Dieses Verfahren scheint jedoch dadurch limitiert zu sein, dass bei einem Teil der untersuchten Patienten wie von Caillot et al. (2001) beschrieben, die typischen frühen radiologischen Zeichen („halo-sign“) nicht kontinuierlich nachweisbar sind. Die Rate der festgestellten „halo-signs“ sank in den ersten sieben Tagen der invasiven pulmonalen Aspergillose von 96 % am ersten Tag auf 22 % am siebten Tag.

Kann im CT ein sogenanntes „air-crescent-sign“ gesehen werden, so handelt es sich um eine bereits bestehende Nekrose, in welche Luft eingeschlossen wurde; pulmonales Gewebe ist also bereits zerstört. Diese Zeichen werden mit Voranschreiten der Erkrankung bei einem steigenden Prozentsatz von Patienten gefunden (Caillot et al., 2001).

Da eine tägliche HR-Computertomographie nicht durchführbar ist, ist die Gefahr gegeben, dass typische Frühzeichen der Infektion nicht beobachtet werden können.

Das Auftreten einer invasiven Aspergillose bei Patienten nach allogener Knochenmark-beziehungweise Stammzelltransplantation wird zum einen innerhalb eines Zeitraumes kurz nach Durchführung der Transplantation (um den 16. Tag) beobachtet. Ein weiterer Gipfel der Erkrankungshäufigkeit wird erst zu einem späten Zeitpunkt, ca. 100 Tage nach KMT beobachtet (Wald et al., 1997). Dies unterstreicht den Bedarf an

Nachweisverfahren, welche bereits bei unspezifischen klinischen Zeichen eine Diagnose erlauben.

Eine erfolgreiche antimykotische Therapie sollte zu einem Zeitpunkt eingeleitet werden, an welchem es noch zu keiner Organmanifestation gekommen ist, d.h. die Diagnose muss während des Zeitraumes einer bestehenden Fungämie gestellt werden. Daher wird von Meyers (1990) die hohe Letalität der invasiven Aspergillose von bis zu 84 % in deren Patientenkollektiv insbesondere der zu späten Diagnosestellung zugeschrieben.

Um in der Lage zu sein, eine präzise Diagnose zu diesem Zeitpunkt zu stellen, an welchem ein Ansprechen auf antimykotische Medikation noch zu erzielen ist, bieten sich molekulare Testverfahren an (Hebart et al., 2000, Stevens, 2002, Verweij & Meis, 2000). Diese sind jedoch durch mangelnde Standardisierung und hohen Zeitaufwand charakterisiert, und daher bislang nur eingeschränkt anwendbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch die Etablierung neuer automatisierter Technologien für die DNA-Extraktion, -Amplifikation und Detektion sowohl die Dauer des molekularen Pilznachweises zu verkürzen, als auch dessen Standardisierung zu erhöhen.

Der molekulare Nachweis von Mykosen, insbesondere einer invasiven Aspergillose, ist noch immer limitiert durch das Fehlen kommerziell erhältlicher Assays und die meisten Polymerasekettenreaktionen zum Pilznachweis basieren auf individuellen Protokollen (Einsele et al., 1997, Fujita et al., 1995, Spreadbury et al., 1993, Van Burik et al., 1998, Yamakami et al. 1998). Neue, schnellere Verfahren zur Detektion von Pilz-DNA, welche auf Echtzeit-PCR Formaten („real-time PCR“) basieren, sind von Brandt et al., 1998 mittels TaqMan und von Löffler et al., 2000 (b) mit dem LightCycler entwickelt worden.

Den größten zeitlichen wie personellen Aufwand erfordert jedoch auch bei Verwendung schneller Amplifikations- und Detektionsverfahren die Extraktion der fungalen Nukleinsäuren. Für einen reliablen Pilz-Nachweis ist es von essentieller Bedeutung, dass die DNA von gleichbleibend hoher Qualität und Reinheit ist, was eine Standardisierung des Extraktionsverfahrens voraussetzt.

Einige Pilzspezies erweisen sich als widerstandsfähig gegenüber konventionellen Lysismethoden (Löffler et al., 1997). Eine Methode, die zuverlässig alle Arten von Pilzzellwänden aufzuschließen vermag, ist also beispielsweise für den molekularen Nachweis von *Aspergillus terreus* oder Mucorales-Arten erforderlich.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass eine automatisierte Extraktion von fungaler DNA aus Zellen, beziehungsweise Hyphen diverser Pilzarten durch MagNA Pure LC™ innerhalb von einer Stunde möglich ist. Im Gegensatz dazu werden für die manuelle Extraktion mindestens vier Stunden benötigt. Die Extraktion von *Aspergillus*- und *Candida*-DNA aus Blutproben ist mit MagNA Pure LC™ in drei Stunden, im Vergleich zu sieben Stunden für das manuelle Protokoll, durchführbar.

Durch Kombination von automatisierter Extraktion mit real-time Amplifikation und Detektion ist ein Nachweis von Pilz-DNA für bis zu 32 Proben in weniger als sechs Stunden, und somit innerhalb eines Arbeitstages durchführbar.

Dadurch ist eine deutlich frühere Therapieinitiation möglich, was von eminenter Bedeutung für die Verbesserung der Prognose von Patienten mit invasiven Mykosen, insbesondere invasiver Aspergillose, zu sein scheint (Meyers, 1990).

Die Pilzlast im Blut ist auch bei Patienten mit histologisch gesicherter invasiver Aspergillose von Löffler et al. (2000b) mit 1-10 „colony forming units“ (CFU) je Milliliter Blut als sehr niedrig beschrieben. Ein molekulares Testverfahren muss daher in der Lage sein, auch geringste Mengen an Pilz-DNA noch zuverlässig nachzuweisen, was sowohl hohe Anforderungen an die Qualität der DNA-Extraktion stellt, als auch sensitive Detektionsmethoden erfordert.

Die Detektionsgrenze des hier etablierten Tests liegt mit unter 10 CFU / ml Blut in einem Bereich, welcher für die klinische Anwendung zur Diagnose einer invasiven Aspergillose als unbedingt erforderlich anzusehen ist (Löffler et al., 1997). Andere Assays beschreiben ähnliche Detektionsgrenzen von unter 10 CFU / ml Blut, wie die Gruppe von Skladny et al., die 1999 einen PCR-Assay mit einer Sensitivität von 1 – 5 CFU / ml Blut veröffentlicht haben. Auch für BAL-Proben sind Polymerasekettenreaktionen mit vergleichbarer Sensitivität wie der in dieser Arbeit entwickelte Assay publiziert worden, beispielsweise von Buchheidt et al. (2002) mit einem Detektionslimit von ebenfalls 1 – 5 CFU / ml BAL.

Eine weitere Anforderung, die an eine Methode zur Pilzdiagnostik gestellt werden muss ist die Kontaminationsfreiheit. Insbesondere *Aspergillus* Sporen kommen ubiquitär vor und werden aerogen übertragen (Latgé, 1999); daher muss eine Kontamination der zu testenden Proben während des Assays ausgeschlossen werden. Da mit dem Gebrauch von MagNA Pure LC™ fast alle manuellen Schritte umgangen werden können, und es sich um ein geschlossenes System handelt, sinkt das Risiko für Kontaminationen deutlich. Der hier präsentierte Test zeigte keine Anfälligkeit für Kontaminationen, da in keiner der 43 Negativkontrollen Pilz-DNA nachgewiesen werden konnte und auch unter den im selben Lauf in MagNA Pure LC™ eingesetzten Proben wurden keine Kontaminationen beobachtet.

Anwender von manuellen Protokollen, beispielsweise die Gruppe von Reiss et al. (2000) berichten hingegen von hohen Raten falsch-positiver Ergebnisse, welche sie auf Kontaminationen der Proben während der Durchführung der Extraktionsmethode zurückführen. Reiss berichtet von einer Studie mit 29 Patienten ohne Verdacht auf eine invasive Aspergillose, von denen im Verlauf bei 26 Patienten mindestens ein positives PCR-Ergebnis auftrat.

Die Extraktion von DNA aus 23 verschiedenen Schimmel- und Hefepilzen ist mit MagNA Pure LC™ erfolgreich durchgeführt worden. Darunter befinden sich einige Pilzspezies, wie *Aspergillus terreus* und *Fusarium solani*, deren DNA mit anderen Methoden nur schwierig zu extrahieren ist (Müller et al., 1998), oder pathogene Schimmelpilze, die mit anderen Tests, wie dem Galactomannan-Antigentest nicht nachweisbar sind (Maertens et al., 1999).

Protokolle, welche die DNA-Extraktion aus derartigen Pilzen beschreiben, sind oft sehr zeit- und arbeitsaufwendig, wie von Gabal 1992 beschrieben, und erfordern häufig chemisch-toxische Methoden unter Verwendung von Phenol und Chloroform (Haynes et al., 1996) oder Guanidinthiocyanat (Sandhu et al., 1995). Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur Zelldisruption mit Hilfe von Glasperlen erlaubte die Eröffnung der Zellwände aller eingesetzten Pilzspezies ohne den Einsatz aufwendiger chemischer oder mechanischer Methoden.

Auch von anderen Gruppen wurden Techniken zur mechanischen Destruktion von Pilzzellwänden mit Glaspartikeln evaluiert (Hopfer et al., 1993), wobei jedoch teilweise

zusätzliche Geräte zur Zelldisruption (Müller et al., 1998) eingesetzt werden mussten, oder keine ausreichende DNA-Menge isoliert werden konnte (Van Burik et al., 1997).

In neuerer Zeit kommen zunehmend Geräte auf den Markt, die eine automatisierte DNA-Extraktion ermöglichen. Biorobot™ 9604 ist das neueste automatisierte Extraktionssystem der Firma Qiagen, welches nach den Vorgaben des Anwenders individuell für dessen Zwecke gestaltet wird. Sowohl Geräte wie auch Software werden unterschiedlich für jeweils eine bestimmte Anwendung von Ingenieuren, Programmierern und Wissenschaftlern kombiniert. Pipettier- und Mischschritte, Hitze- und Kälteinkubationen, sowie Vakuumfiltration können auf der Arbeitsplattform zusammengestellt werden (www.qiagen.com).

Der Extraktionsautomat stellt jedoch ein offenes Kompartiment da, so dass die Isolation von fungalen Nukleinsäuren aufgrund des hohen Risikos einer aerogenen Kontamination nicht praktikabel ist.

In der Literatur sind Assays zur Extraktion von HBV-DNA und HCV-RNA (Jongorius et al., 2000, Mitsunaga et al., 2002), CMV-DNA (Tedder et al., 2002) und DNA zur Sequenzierung aus *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas putida* und *Schizosaccharomyces pombe*, sowie humane klonale cDNA (Hilbert et al., 2000) beschrieben worden.

Zur Anwendung von BioRobot™ auf die Isolierung von Pilz-DNA sind bisher keine Publikationen erschienen.

Die Gruppe von Espy et al. (2001) beschreibt den Vergleich des BioRobot™ mit MagNA Pure LC™ für die Extraktion von HSV-DNA. Sie kommen zu der Aussage, dass die Anwendung der beiden Geräte in Zeit- und Kostenaufwand vergleichbar ist, die BioRobot™ Methode jedoch durch externe Zentrifugationen zusätzliche manuelle Schritte erfordert, welche den automatisierten Ablauf unterbrechen.

Cobas AmpliPrep™ der Firma Roche ist ein Gerät zur automatisierten DNA-Extraktion für das Cobas Amplicor® System. Bisher ist die Anwendung beschränkt auf die Extraktion von HCV- und HIV-RNA zum experimentellen, nichtklinischen Gebrauch (www.roche-diagnostics.com). Nach Lysierung des Viruskapsids binden spezifische biotinylierte Sonden an die Zielsequenz. Nach der Hybridisierung wird der Komplex

aus Sonde und Ziel-DNA an Streptavidin- beschichtete Magnetperlen gebunden. Es folgen Wasch- und Elutionsschritte. Alle Schritte finden in einem geschlossenen Gerät statt, die Proben müssen nicht manipuliert werden, was das Risiko einer Kontamination von außen gering erscheinen lässt (Roche Molecular Systems, Inc., 2000).

Die Anwendung des Systems für die Extraktion von Pilz-DNA ist jedoch noch nicht evaluiert worden. Jungkind (2001) beschreibt die schnelle und hochwertige Extraktion von RNA aus HCV mit Hilfe von AmpliPrep™ und betont die Bedeutung automatisierter Techniken in der zukünftigen Diagnostik von Infektionen.

In zunehmendem Maße spielen die Kosten einer diagnostischen Methode eine wichtige Rolle im klinischen Alltag. Eine Extraktion von Pilz-DNA aus Blut mit MagNA Pure LC™ kostet mit der beschriebenen Methode vier Euro je Probe, im Vergleich dazu sind für die manuelle Methode ebenfalls zirka vier Euro je Probe zu veranschlagen. Die Kosten der manuellen Extraktion werden insbesondere durch die Verwendung der rekombinanten Lyticase verursacht. Nicht berücksichtigt ist in diesem Vergleich der wesentlich höhere Personalaufwand für die manuelle Extraktion, welcher zusätzlich kalkuliert werden muss.

Im Vergleich zu etablierten und kommerziell erhältlichen Antigentests wie dem Galactomannan-ELISA wird von DNA-nachweisenden Methoden eine bessere Möglichkeit zum Monitoring erwartet. Von einigen Autoren wird die PCR als sensitivere und zuverlässigere Methode zur Diagnostik invasiver Aspergillosen beschrieben. Yamakami et al. (1998) beschreiben die Untersuchung von 141 Blutproben bei 30 Patienten mit Aspergillom, chronisch nekrotisierender pulmonaler Aspergillose, invasiver pulmonaler Aspergillose oder Empyem. Bei 16 / 30 Patienten (53 %) ergaben sich positive PCR-Befunde, wohingegen nur 11 / 30 (37 %) im GM-Test positiv getestet wurden. Ähnliche Ergebnisse beschreiben Williamson et al. (2000), die von einer Sensitivität der PCR zur Diagnose einer invasiven Aspergillose von 81 %, einer Spezifität von 100 % und einem positiven prädiktiven Wert von 100 % berichten.

Insbesondere bei pädiatrischen Patienten wird von einem hohen Anteil falsch-positiver Testergebnisse im Galactomannan-Nachweis berichtet (Maertens et al., 1999). Die Autoren vermuten als Ursache hierfür nutritive Faktoren; insbesondere der Verzehr von

Zerealien scheint mit dem Auftreten positiver Ergebnisse zu korrelieren. Dies könnte durch den hohen Galactomannangehalt dieser Nahrungsmittel und die durch Chemotherapeutika vorgeschädigte intestinale Mukosa der Kinder zu erklären sein (Letscher-Bru et al., 1998, Herbrecht et al., 2002).

Becker et al. (2000) beschreiben ein Tiermodell, in welchem Blut und BAL von Ratten mit invasiver Aspergillose gewonnen und mittels PCR und Galactomannan-ELISA analysiert wurde. In diesem Modell zeigte sich eine höhere Sensitivität des GM-Tests, jedoch ist zu berücksichtigen, dass die Durchführung der DNA-Extraktion und PCR stark modifiziert wurde. Die Intensität der Zentrifugationen wurde vermindert, die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmix und das Temperaturprofil wurden verändert. Das Protokoll entspricht also nicht dem von Einsele et al. (1997) publizierten Assay und hat möglicherweise durch die Modifikationen an Sensitivität verloren.

Zukünftige Anwendungen

Dass nur ein maximales Volumen von 200 µl Blut oder Zellpellet initial in MagNA Pure LC™ eingesetzt werden kann, stellt möglicherweise eine Einschränkung in der Anwendbarkeit auf klinische Proben dar. Wie erwähnt ist die Erregerdichte selbst bei dokumentierten Pilzinfektionen mit 1 – 10 CFU / ml nicht hoch (Löffler et al., 2000b). Die Chance für einen positiven Erregernachweis steigt also, je größer das untersuchte Volumen an potentiell infiziertem Probematerial ist.

Die Menge an einsetzbarem Probenmaterial ist jedoch im Grunde nicht variabel, da die Probengefäße nur ein maximales Fassungsvermögen von 200 µl aufweisen und andere Plastikwaren nicht in das Gerät passen.

Costa et al. (2002) haben vor kurzem eine automatisierte Methode zur Extraktion von *Aspergillus fumigatus* DNA mit MagNA Pure LC™ publiziert. Es bestehen mehrere Unterschiede zu der hier beschriebenen Methode: Costa et al. wenden keine zusätzlichen Methoden zum Aufschließen der Pilzzellwände an, die DNA wird nicht aus Vollblut, sondern aus Serum extrahiert und ein geringeres Probenvolumen wird analysiert. Dies können Gründe dafür sein, dass in der retrospektiven Analyse von Patienten mit invasiver Aspergillose nur 45 % der Serumproben positive PCR-

Ergebnisse erhielten. Wie in der hier vorliegenden Arbeit beschrieben, ist nur durch zusätzliche Arbeitsschritte zur Disruption der fungalen Zellwand eine zuverlässige DNA-Isolation möglich.

Vorergebnisse zeigen, dass die Vorteile der real-time PCR in ihrer Schnelligkeit und Reproduzierbarkeit liegen (Löffler et al., 2000, Mitsunaga et al., 2002). Im Vergleich zur konventionellen PCR mit anschließendem PCR-ELISA scheint sie, bei vergleichbarer Sensitivität, eine weniger aufwendige Methode zum Pilznachweis darzustellen.

Für Proben, die aus Kulturmaterial oder mit Pilzkultur beimpften Blutproben bestehen, ist die Sensitivität des entwickelten Verfahrens mit 10^0 CFU für den Nachweis von *Candida albicans* und $10^1 - 10^0$ CFU für die Detektion von *Aspergillus fumigatus* ausreichend hoch.

Die zur Evaluation der entwickelten Methode untersuchten Patientenproben erlaubten keine eindeutige Aussage über die Bewertung dieser neu entwickelten Methode zum Pilznachweises, da im Verlauf nur sehr wenige Patienten positive Testergebnisse hatten. Auch die Diskordanz der Ergebnisse einiger Patientenproben, welche im PCR-ELISA positiv waren, im MagNA Pure LC™ jedoch negativ verblieben sind, muss weiter beobachtet werden. Bei den innerhalb dieser Arbeit analysierten Proben, welche bei positivem PCR-ELISA MagNA Pure LC™ negativ verblieben sind, konnte anhand der klinischen Daten und fortführender Diagnostik mit großer Wahrscheinlichkeit gezeigt werden, dass die Symptomatik (FUO) auf andere Infektionserreger als Pilze zurückzuführen war.

So konnte in einem Fall eine *Pneumocystis carinii* Pneumonie für die Symptomatik verantwortlich gemacht werden, ein anderer Patient litt an einer pulmonalen Infektion durch „respiratory syncytial“ Virus, bei einer Patientin wurden die Infektionssymptome durch eine hämorrhagische Zystitis ausgelöst und bei zwei weiteren Patienten konnten zum Zeitpunkt des fraglich positiven Testergebnisses keinerlei klinische Hinweise auf eine Infektion gefunden werden.

Daher sind die Ergebnisse des PCR-ELISA in diesen Fällen nach Überprüfung der Akten wohl als falsch-positiv anzusehen.

Die Anwendbarkeit auf klinische Proben muss jedoch noch weiter evaluiert werden, da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine genaue Aussage darüber möglich ist, ob die Sensitivität für diese „echten“ Proben geringer ist als in vitro. Auch die Tatsache, dass nicht letztlich geklärt ist, in welcher Form Pilze oder fungale DNA in der Blutbahn vorliegen (Löffler et al., 2002), trägt dazu bei, dass keine endgültige Aussage über die Vergleichbarkeit inokulierter mit Originalblutproben gemacht werden kann.

Weitere Untersuchungen klinischer Materialien an größeren Patientenkollektiven müssen durchgeführt werden, um zu zeigen, ob der molekulare Pilznachweis Vorteile hinsichtlich der Sensitivität der Methode oder des Zeitpunkts der Diagnosestellung im Vergleich zu anderen Testverfahren wie dem Galactomannan-Nachweis mit sich bringt. Auch eine Kombination beider Verfahren, beispielsweise bei Hochrisiko-Patienten, wird von manchen Autoren in Betracht gezogen (Costa et al., 2002).

Des Weiteren muss ausführlich untersucht werden, inwiefern eine frühere Diagnose die Prognose der Patienten verbessern kann, und ob ein Therapiemonitoring mit der Pilz-PCR sinnvoll sein könnte. Für diese Untersuchungen sind große Patientenkollektive und engmaschige Tests unerlässlich.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine automatisierte Methode zur Extraktion von fungalen Nukleinsäuren entwickelt und an klinischen Proben evaluiert. Die Methode basiert auf dem Extraktionsautomaten MagNA Pure LC™ (Roche Diagnostics) und wurde zur Aufspaltung der rigiden Pilzzellwände durch die Anwendung von Glasperlen erweitert.

Mit dieser Methode konnte die DNA von insgesamt 23 verschiedenen Hefe- und Schimmelpilzen erfolgreich isoliert werden. Serielle Verdünnungen von *Aspergillus fumigatus* Konidien und *Candida albicans* Zellen (jeweils von 10^6 bis 10^0 CFU / ml) wurden zur Evaluierung der Sensitivität des Verfahrens eingesetzt. Außerdem wurde die DNA aus 68 klinischen Proben von 31 hämatologischen Patienten (57 Blutproben und 11 BALs), extrahiert und die PCR-Ergebnisse mit denen der manuellen, etablierten Methode verglichen.

Die mit der neu entwickelten Methode isolierte DNA war reproduzierbar bis zu einem Detektionslimit von 10^1 CFU nachweisbar. Für *C. albicans* und in 9 / 28 Extraktionsläufen auch für *A. fumigatus* waren 10^0 CFU detektierbar. Insgesamt ist die Sensitivität der entwickelten Methode mit der des Routineprotokolls vergleichbar und ausreichend, um fungale DNA in Patientenblut, welches im Allgemeinen eine sehr geringe Pilzlast von 10^0 – 10^1 CFU aufweist, nachzuweisen.

Die DNA aller 23 verwendeten Pilze konnte durch real-time PCR mit dem LightCycler Instrument (Roche Diagnostics) amplifiziert werden. Die Detektion des Amplifikats erfolgte durch spezifische LightCycler Sonden oder mittels anschließender Gelelektrophorese.

Kontaminationen aus der Umgebung stellen bei der Extraktion von fungaler DNA ein wichtiges Problem dar. In der hier gezeigten Arbeit verblieben alle 43 mitgeführten Negativkontrollen negativ. Es traten keine Kontaminationsprobleme aus der Umgebung oder zwischen einzelnen Proben auf.

Der Zeitaufwand für den molekularen Pilznachweis aus Blutproben konnte durch die Etablierung automatisierter Techniken auf drei Stunden reduziert werden. Das etablierte Protokoll hingegen nimmt allein zur DNA-Extraktion 7 Stunden in Anspruch. Insbesondere für immunsupprimierte Patienten mit Verdacht auf eine invasive Pilzinfektion ist eine schnelle Bestätigung der Diagnose und frühzeitige Therapieeinleitung für die Prognose von entscheidender Wichtigkeit.

Die Materialkosten des entwickelten automatisierten Testverfahrens belaufen sich auf zirka vier Euro, was den Kosten für die manuelle Extraktion entspricht. Bei der automatisierten Methode ist jedoch der Personalaufwand erheblich geringer, was die Kosten senkt.

Zur Evaluierung der neuen Methode wurden 68 Patientenproben parallel im Routineverfahren und durch den MagNA Pure LC™ Assay analysiert. In 63 Fällen stimmten die Ergebnisse überein. Fünf Proben, die im Routinetest positive Resultate für *Aspergillus fumigatus* oder für *Candida albicans* zeigten, verblieben im MagNA Pure LC™ jeweils Assay negativ. Bei einer retrospektiven Analyse der klinischen Daten und Testergebnissen aus der Medizinischen Mikrobiologie und Virologie von den entsprechenden Patienten konnte in allen Fällen gezeigt werden, dass keine invasive Mykose vorgelegen hat.

Die Anwendung von MagNA Pure LC™ und das entwickelte Protokoll zur Extraktion von Pilz-DNA erwies sich als schnelle, sensitive und reproduzierbare Methode zur molekularen Diagnostik invasiver Mykosen. Sie leistet damit einen Beitrag zur Standardisierung molekularer Nachweisverfahren von Pilzinfektionen.

6 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

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

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

J Clin Microbiol, 40, 2240-2243

Löffler J., Hebart H., Henke N., Schmidt K., Einsele H. (2002)

„Quantification and speciation of fungal DNA in clinical specimens using the LightCycler instrument“

in: Reischl U., Wittwer C., Cockerill F. (Eds.)

„Rapid Cycle Real-Time PCR - Methods and Applications“

Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg 2002

Schmidt K., Löffler J., Hebart H., Schumacher U., Einsele H. (2001)

„Rapid extraction and detection of DNA from Candida species in research samples by MagNA Pure LC and the LightCycler system“

Biochemica 3/2001, 8-10

Schmidt K., Heininger A., Gentner T., Winter-Emden J., Baumann A., Doering G., Hebart H., Einsele H., Löffler J. (2002)

„Fully automated extraction of bacterial, fungal and viral DNA from blood specimens“

Poster No 1063

42nd ICAAC, San Diego, CA, USA, 27. – 30. September 2002

Session 212, Molecular Diagnostic Tests

Poster erhielt den „Student’s Travel Grant 2002“

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Ampuwa	steriles Wasser für Injektionszwecke
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CFU	colony forming units
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CT	Computertomographie
ddH ₂ O	zweifach destilliertes, steriles Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA-abbauendes Enzym
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fab	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers
FRET	Fuoreszenz Resonanz Energie Transfer
FUO	fever of unknown origin
g	Gravitationskraft, bzw. Gramm
G-CSF	granulocyte - colony stimulating factor
GM	Galactomannan
GM-CSF	granulocyte - macrophage - colony stimulating factor
GvHD	Graft versus Host Disease
h	Stunde

H ₂ O	Wasser
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigens
HR-CT	high-resolution CT = hochauflösende Computertomographie
HSV	Herpes simplex Virus
IA	invasive Aspergillose
ICAAC	Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy
IFN _γ	Interferon gamma
KMT	Knochenmarktransplantation
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
m	Meter, bzw. milli-
M	molar
MD	Myelodysplastisches Syndrom
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MSU	Mittelstrahlurin
n	nano-
NaCl	Natriumchlorid
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
p	piko-
PCR	Polymerasekettenreaktion
RCLB	red cell lysis buffer
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA

RSV	respiratory syncytial virus
s	Sekunde
ssu	small subunit (kleine Untereinheit des Ribosoms)
SZT	Stammzelltransplantation
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Tm	Schmelztemperatur
TX	Transplantation
U	Unit
UV	ultaviolett Licht
V	Volt
V.a.	Verdacht auf
WCLB	white cell lysis buffer
Z.n.	Zustand nach
ZNS	zentrales Nervensystem
°C	Grad Celsius
μ	mikro-

8 Herkunftsbezeichnungen

Geräte

Gelkammer	Horizon 11.14	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
ELISA-Reader	Rainbow	SLT, Crailsheim
ELISA-Rüttler	MR	SLT, Crailsheim
Horizontalwippe	WS 5	Bühler, Tübingen
PCR-Prozessor	GeneAmp 2400	Perkin Elmer, Foster City, USA
Photometer	LS 500	Dr. Lange, Berlin
Pipetten	Variopetten	Eppendorf, Hamburg
Sterilbänke	Biogard	Baker Company, Stanford, USA
	LaminAirHBB 2448	Heraeus, Hanau
Vortex	Genie 2	Bender & Hobein, Rottenburg
Zentrifugen	Rotixa IKS	Hettich, Tuttlingen
	LC Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim
Wasserbad	GFL 1986	Bender & Hobein, Rottenburg
LightCycler Instrument		Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC TM		Roche Diagnostics, Mannheim

Verbrauchsgegenstände

Reaktionsgefäße	MagNA Pure LC	Roche Diagnostics, Mannheim
	PCR-Gefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
	Safe-Lock Gefäße	Eppendorf, Hamburg
	PS 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Kits		Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler Kits	Hybridization Probes	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler Kapillaren		Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure Kits	totalNA	Roche Diagnostics, Mannheim
	HighPure DNA	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAmp Tissue Kits		Qiagen, Hilden
Glass beads	180 Micron	Sigma, Deisenhofen

QIAquick Purification Kit
DyeDeoxy Terminator Kit
Centri-Sep-Säulen

Qiagen, Hilden
Perkin Elmer, Foster City, USA
Perkin Elmer, Foster City, USA

Chemikalien

Ampuwa
Agarose
Basenpaarmarker
Ethanol
Sabouraud-Glucose-Agar

Fresenius, Bad Homburg
Sigma, Deisenhofen
Invitrogen, Karlsruhe
Merck, Darmstadt
Biomérieux, Marne-la-Vallée,
Frankreich

Red Cell Lysis Buffer
RCLB

Roche Diagnostics, Mannheim
Universitätsapotheke Tübingen

Laufpuffer „blue juice“

GIBCO BRL, Gaithersburg,
USA

TAE-Puffer

GIBCO BRL, Gaithersburg,
USA

Gelstar

Biozym, Hessisch Oldendorf

Enzyme, Nukleotide, Primer, Antikörper

Proteinase K
Lyticase
Primer
LightCycler Sonden
dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Roche Diagnostics, Mannheim
Sigma, Deisenhofen
Roth, Karlsruhe
TibMolBiol, Berlin
Promega, Madison, USA

Abbildungen

Die Abbildungen zu MagNA Pure LC™ und LightCycler in den Kapiteln 1 und 2 wurden mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Michael Klose von der Firma Roche Diagnostics aus dem Internet (<http://biochem.roche.com>) heruntergeladen und in dieser Arbeit abgedruckt.

9 Literatur

Becker M.J., de Marie S., Willemsse D., Verbrugh A., Bakker-Woudenberg I.A.J.M. (2000)

„Quantitative Galactomannan Detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary Aspergillosis in an experimental rat model”
J Clin Microbiol, 38, 1434-1438

Bodey G., Bueltmann B., Duguid W., Gibbs D., Hanak H., Hotchi M., Mall G., Martino P., Meunier F., Milliken S. (1992)

„Fungal infections in cancer patients: An international autopsy survey“
Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 11, 99-109

Brandt M.E., Padhye A., Mayer L.W., Holloway B.P. (1998)

“Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and TaqMan automated detection in identification of *Aspergillus fumigatus*”
J Clin Microbiol, 36, 2057-2062

Brummer E., Anjum M., Stevens D.A. (2002)

„Protection of peritoneal macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) against dexamethasone suppression of killing of *Aspergillus*, and the effect of human GM-CSF”
Microbes Infect, 4, 133-138

Buchheidt D., Baust C., Skladny H., Baldus M., Bräuninger S., Hehlmann R. (2002)

„Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients”
Br J Haematol, 116, 803-811

Caillot D., Casasnovas O., Bernard A., Couaillier J.F., Durand C., Cuisenier B., Solary E., Piard F., Petrella T., Bonnin A., Couillaud G., Dumas M., Guy H. (1997)

“Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery”
J Clin Oncol, 15, 139-147

Caillot D., Couaillier J.F., Bernard A., Casasnovas O., Denning, D.W., Mannone L., Lopez J., Couillaut G., Piard F., Vagner O., Guy H. (2001)

“Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia”

J Clin Oncol, 19, 153-159

Cenis J. (1992)

“Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification”

Nucleic Acids Res, 20, 2380

Chandrasekar P.H., Weinmann A., Shearer C. (1995)

„Autopsy-identified infections among bone marrow transplant recipients: A clinico-pathologic study of 56 patients“

Bone Marrow Transplant, 16, 675-681

Costa C., Costa J-M., Desterke C., Botterel F., Cordonnier C., Bretagne S. (2002)

“Real-time PCR coupled with automated DNA Extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis”

J Clin Microbiol, 40, 2224-2227

De Marie S. (2000)

“New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections”

Haematologica, 85, 88-93

Denning D.W. (1994)

“Treatment of invasive aspergillosis”

J Infect, 28, 25-33

Denning D.W. (1996)

„Therapeutic outcome in invasive aspergillosis“

Clin Infect Dis, 23, 608-615

Denning D.W. (1998)

„Invasive aspergillosis“

Clin Infect Dis, 26, 781-805

Duthie D., Denning D.W. (1995)

„Aspergillus fungemia: report of 2 cases and review“
Clin Infect Dis, 20, 598-605

Einsele H., Hebart H., Roller G., Löffler J., Rothenhöfer I., Müller C.A., Bowden R.A., van Burik J.A., Engelhard D., Kanz L., Schumacher U. (1997)

„Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes“
J Clin Microbiol, 35, 1353-1360

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 T. 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, 1278-1284

Einsele H. (2002) persönliche Mitteilung 24.06.02

Espy M.J., Rys P.N., Wold A.D., Uhl J.R., Sloan L.M., Jenkins G.D., Ilstrup D.M., Cockerill F.R. 3rd, Patel R., Rosenblatt J.E., Smith T.F. (2001)

„Detection of herpes simplex virus DNA in genital and dermal specimens by LightCycler PCR after extraction using the Isoquick, MagNA Pure, and BioRobot 9604 methods“
J Clin Microbiol, 39, 2233-2236

Fujita S., Lasker B.A., Lott T.J., Reiss E., Morrison C.J. (1995)

“Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from Candida species in blood”
J Clin Microbiol, 33, 962-967

Gabal M. (1992)

„Development of a chromosomal DNA probe for the laboratory diagnosis of aspergillosis“
Mycopathologia, 106, 121-129

- Grauer M.E., Bokemeyer C., Welte T., Freund M., Link H. (1993)
 „Successful treatment of Mucor pneumonia in a patient with relapsed lymphoblastic leukemia after bone marrow transplantation“
 Bone Marrow Transplant, 12, 421
- 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
- Haynes K., Westerneng T., Fell J., Moens W. (1996)
 „Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA“
 J Med Vet Mycol, 33, 319-325
- 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
- Hebart H., Loeffler J., Kanz L., Einsele H. (2000)
 “Molecular methods in the diagnosis of infections in the immunocompromised host“
 Curr Opin Infect Dis, 13, 355-359
- Herbrecht R., Letscher-Bru V., Oprea C., Lioure B., Waller J., Campos F., Villard O., Liu K.L., Natarajan-Ame S., Lutz P., Dufour P., Bergerat J.P., Candolfi E. (2002)
 “Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients”
 J Clin Oncol, 20, 1898-1906
- Hilbert H., Lauber J., Lubenow H., Dusterhoft A. (2000)
 „Automated sample-preparation technologies in genome sequencing projects“
 DNA-Seq, 11, 193-197
- Hopfer R., Walden P., Setterquist S., Highsmith W. (1993)
 „Detection and differentiation of fungi in clinical specimen using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis“
 J Med Vet Mycol, 31, 65-75

Jones J.M. (1990)

„Laboratory diagnosis of invasive Candidiasis“
Clin Microbiol Rev, 3, 32-45

Jongerius J.M., Bovenhorst M., van der Poel C.L., van Hilten J.A., Kroes A.C., van der Does J.A., van Leeuwen E.F., Schuurman R. (2000)

“Evaluation of automated nucleic acid extraction devices for application in HCV NAT”
Transfusion, 40, 871-874

Jungkind D. (2001)

„Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction – our past, our present, our future“
J Clin Virol, 20, 1-6

Lapopin L., Kirchgesser M. (2000)

„MagNA Pure LC: Evaluation as a sample preparation system for the LightCycler instrument“
Biochemica 1/2000, 10-16

Latgé J.-P. (1999)

„Aspergillus fumigatus and invasive aspergillosis“
Clin Microbiol Rev., 12, 310-350

Letscher-Bru V., Cavalier A., Pernot-Marino E., Koenig H., Eyer D., Waller J., Candolfi E. (1998)

„Recherche d'antigène galactomannane aspergillaire circulant par platelia Aspergillus: antigénémies positives persistantes en l'absence d'infection“
J Mycol Med, 8, 112-113

Löffler J. (1997)

„Etablierung und Evaluierung molekularbiologischer Nachweismethoden humanpathogener Pilze und Charakterisierung azolresistenter Pilzstämme isoliert aus immunsupprimierten Patienten“
Dissertationsarbeit, Universität Tübingen, Fakultät für Biologie

Löffler J., Hebart H., Schumacher U., Reitze H., Einsele H. (1997)

„Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood“
J Clin Microbiol, 35, 3311-3312

- Löffler J., Hebart H., Sepe S., Schumacher U., Klingebiel T., Einsele H. (1998)
 „Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system“
 Med Mycol, 36, 275-279
- Löffler J., Hebart H., Bialek R., Hagemeyer L., Schmidt D., Serey F.-P., Hartmann M., Eucker J., Einsele H. (1999)
 „Contaminations occurring in fungal PCR assays“
 J Clin Microbiol, 37, 1200-1202
- Löffler J., Hebart H., Magga S., Schmidt D., Klingspor L., Tollemar J., Schumacher U., Einsele H. (2000a)
 „Identification of rare Candida species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization“
 Diagn Microbiol Infect Dis, 38, 207-212
- Löffler J., Henke N., Hebart H., Schmidt D., Hagemeyer L., Schumacher U., Einsele H. (2000b)
 „Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler system“
 J Clin Microbiol, 38, 586-590
- Löffler J., Klöpfer K., Hebart H., Najvar L., Graybill J.R., Kirkpatrick W.R., Patterson T.F., Dietz K., Bialek R., Einsele H. (2002)
 „Detection of Aspergillus-DNA by polymerase chain reaction from experimental models of invasive aspergillosis“
 J Infect Dis, 185, 1203-1206
- Maertens J., Verhaegen J., Demuyneck H., Brock P., Verhoef G., Vandenberghe P., Van Eldere J., Verbist L., Boogaerts M. (1999)
 „Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis“
 J Clin Microbiol, 37, 3223-3228
- Maschmeyer G., Link H., Hiddemann W., Meyer P., Helmerking M., Eisenmann E., Schmitt J., Adam D. (1994)
 „Pulmonary infiltrations in febrile patients with neutropenia. Risk factors and outcome under empirical antimicrobial therapy in a randomized multicenter study“
 Cancer, 73, 2296-304

- Meyers J.D. (1990)
“Fungal infections in bone marrow transplant patients”
Semin Oncol, 17, 10-13
- Mitsunaga S., Fujimura K., Matsumoto C., Shiozawa R., Hirakawa S., Nakajima K., Tadokoro K., Juji T. (2002)
“High-throughput HBV DNA and HCV RNA detection system using a nucleic acid purification robot and real-time detection PCR: its application to analysis of posttransfusion hepatitis”
Transfusion, 42, 100-106
- Morrison V.A., Haake R.J., Weisdorf D.J. (1994)
„Non-Candida fungal infections after bone marrow transplantation: Risk factors and outcome“
Am J Med, 96, 497-503
- Müller F.M., Werner K.E., Kasai M., Francesconi A., Chanock S.J., Walsh T.J. (1998)
„Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption“
J Clin Microbiol, 36, 1625-1629
- Qiagen (1999)
“Biorobot™ 9604 – Automated nucleic acid preparation”
Produktinformation, No. 1012375 09/99
- Rankin N.E. (1953)
„Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with agranulocytosis and antibiotic therapy“
Br Med J, 183, 918-919
- Reiss E., Obayashi T., Orle K., Yoshida M., Zancope-Oliveira M. (2000)
“Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections”
Med Mycol, 38 (Suppl 1), 147-159
- Roche Molecular Systems Inc. (2000)
„Cobas AmpliPrep™”
Produktinformation, No. 13-93-PO94001

Saiki R.K., Gelfand G.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi S., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988)

“Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase”
Science, 239, 487-491

Sandhu G., Kline B., Stockman L., Roberts G. (1995)

„Molecular probes for diagnosis of fungal infections“
J Clin Microbiol, 33, 2913-2919

Skladny H., Buchheidt D., Baust C., Krieg-Schneider F., Seifarth W., Leib-Mösch C., Hehlmann R. (1999)

„Specific detection of Aspergillus species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR“
J Clin Microbiol, 37, 3865-3871

Spreadbury C., Holden D., Aufauvre-Brown A., Bainbridge B., Cohen J. (1993)

“Detection of Aspergillus fumigatus by polymerase chain reaction”
J Clin Microbiol, 31, 615-621

Stevens D.A. (2002)

“Diagnosis of fungal infections: current status”
J Antimicrob Chemother, 49, 11-19

Tedder R.S., Ayliffe U., Preiser W., Brink N.S., Grant P.R., Peggs K.S., Mackinnon S., Kreig-Schneider F., Kirk S., Garson J.A. (2002)

„Development and evaluation of an internally controlled semiautomated PCR assay for quantification of cell-free cytomegalovirus“
J Med Virol, 66, 518-523

Van Burik J.A., Schreckhise R.W., Myerson D., White T.C., Bowden R.A. (1997)

“Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi”
In: Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, Abstr. F-12, p. 262

Van Burik J.A., Myerson D., Schreckhise R.W., Bowden R.A. (1998)

“Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens”
J Clin Microbiol, 36, 1169-1175

- Verweij P.E., Meis J.F.G.M. (2000)
„Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients“
Transpl Infect Dis, 2, 80-87
- Wald A., Leisenring W., van Burik J.A., Bowden R.A. (1997)
„Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation“
J Infect Dis, 175, 1459-1466
- Walsh T.J., Gonzalez C., Lyman C.A., Chanock S.J., Pizzo P.A. (1996)
„Invasive fungal infections in children: recent advances in diagnosis and treatment“
Adv Pediatr Infect Dis, 11, 187-290
- Walsh T.J., Finberg R.W., Arndt C., Hiemez J., Schwartz C., Bodensteiner D., Pappas P., Seibel N., Greenberg R.N., Dummer S., Schuster M., Holcenberg J.S. (1999)
“Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group”
N Engl J Med, 340, 764-771
- Wenzel R.P. (1995)
„Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality“
Clin Infect Dis, 20, 1531-1534
- 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 adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation“
Br J Haematol, 104, 560-568
- Williamson E.C.M., Leeming J.P., Palmer H.M., Steward C.G., Warnock D., Marks D.I., Millar M.R. (2000)
“Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction”
Br J Haematol, 108, 132-139

www.roche-diagnostics.com/

Produktinformation über Cobas Ampliprep™

www.qiagen.com/

„More than just instruments – BioRobot 9600“
Produktinformation über Biorobot TM

Yamakami Y., Hasimoto A., Yamagata E., Kamberi P., Karashima R., Nagai H., Nasu M. (1998)

“Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis”
J Clin Microbiol, 36, 3619-3623

Yera H., Sendid B., Francois N., Camus D., Poulain D. (2001)

“Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis”
Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 20, 864-870

Curriculum vitae

22. Mai 1978	geboren in Leonberg
1984 – 1988	Spitalhof Grundschule in Leonberg
1988 – 1997	Evang. Mörike-Gymnasium Stuttgart
Juni 1997	Abitur
1998 – 2004	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
März 2000	Ärztliche Vorprüfung
November 2000	Beginn der Promotion an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
März 2001	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
März 2003	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
April 2003 – März 2004	Praktisches Jahr am Marienhospital Stuttgart, Universitätskinderklinik Tübingen und St. Bartholomew's Hospital, University of London, UK
November 2004	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung
25. November 2004	Erteilung der Approbation als Ärztin Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung 1,86