

**Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universitätsklinik
Tübingen**

Direktor: Professor Dr. J. Knobloch

**Vergleichende molekularbiologische Untersuchung
von Pilzbällen aus humanen Sinus maxillaris**

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

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

**vorgelegt von
Simone Isabelle Lange
aus
Stuttgart**

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Bialek

2. Berichterstatter: Frau Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Aspergillose.....	1
1.2 Zygomycose.....	4
1.3 Pilzinfektionen der Nase und Nasennebenhöhlen.....	6
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Reagenzien und Geräte.....	11
2.1.1 Kommerziell erhältliche Kits.....	11
2.1.2 Enzyme und Chemikalien.....	11
2.1.3 Pufferrezepturen.....	12
2.1.4 Geräte.....	12
2.1.5 Verbrauchsmaterial.....	14
2.2 Untersuchungsmaterial.....	14
2.2.1 Paraffin-eingebettete Gewebeproben/ „fungus balls“.....	14
2.2.2 Aspergillus-PCR mit verschiedenen Pilz-Spezies.....	15
2.2.3 Identifizierung von <i>Aspergillus</i> -Stämmen.....	15
2.2.4 Ringversuch.....	15
2.3 Methoden.....	16
2.3.1 DNA-Extraktion.....	16
2.3.2 Amplifikation Zygomyceten-spezifischer DNA.....	17
2.3.3 Aspergillus- spezifische-PCR.....	20
2.3.4 Gelelektrophorese der Amplifikate.....	21
2.3.5 Kontrollen.....	22
2.3.6 Nachweis der DNA-Extraktion.....	24
2.3.7 Aufreinigung und Sequenzierung der Amplifikate.....	27
3. Ergebnisse.....	31
3.1 Paraffin-eingebettete Gewebeproben.....	31

3.1.1	Aspergillus-PCR.....	31
3.1.2	Zygomyceten-PCR.....	31
3.1.3	Aspergillus- und Zygomyceten-PCR.....	32
3.1.4	β -Globin- und GAPDH-PCR.....	33
3.1.5	Vergleich mit den früheren PCR-Ergebnissen aus Wien	34
3.2	Aspergillus-PCR mit verschiedenen Pilzspezies.....	38
3.2.1	Sequenzen der Aspergillus-PCR-Amplifikate verschiedener <i>Aspergillus</i> -Spezies.....	38
3.2.2	Spezifität der PCR-Verfahren.....	40
3.3	Identifizierung verblindeter <i>Aspergillus</i> -Stämme.....	40
3.4	Aspergillus-Ringversuch.....	43
4.	Diskussion.....	47
4.1	Paraffin-eingebettete Gewebeproben.....	47
4.1.1	Aspergillus-PCR.....	47
4.1.2	Zygomyceten-PCR.....	48
4.1.3	Aspergillus- und Zygomyceten-PCR.....	51
4.1.4	β -Globin- und GAPDH-PCR.....	52
4.1.5	Vergleich mit den früheren PCR-Ergebnissen aus Wien	53
4.2	Aspergillus-PCR mit verschiedenen Pilzspezies.....	57
4.3	Identifizierung verblindeter <i>Aspergillus</i> -Stämme.....	58
4.4	Aspergillus-Ringversuch.....	59
4.5	Chancen und Limitierung der Pilz-PCR im Allgemeinen.....	60
5.	Zusammenfassung.....	65
6.	Literaturverzeichnis.....	67
7.	Anhang.....	79
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	79
7.2	Tabellen und Abbildungen.....	81

1. Einleitung

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden therapeutische Fortschritte in der Medizin von einem unerwünschten Anstieg lebensbedrohlicher Infektionen begleitet. Dieser Anstieg ist vornehmlich auf eine wachsende Risikopopulation zurück zu führen [69]. Diese umfasst Personen mit HIV-Infektion, mit Malignomen, mit Therapie bedingter Immunsuppression, sowie Empfänger von Organtransplantaten. Am auffälligsten ist die Zunahme der Schimmelpilzinfektionen im Zusammenhang mit allogenen Knochenmarkstransplantationen: Hier stellen die invasiven Aspergillosen mit einer Inzidenz von bis zu 28,3% bei einer Letalität von 88% derzeit die bedrohlichsten invasiven Mykosen dar [104]. Die Zygomycose ist mit einem Auftreten von 2,5% bei Stammzelltransplantierten und 2% bei Patienten mit hämatologischen Malignomen nach Hefepilzinfektionen durch *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. die dritthäufigste Pilzinfektion. In Autopsien von Leukämiepatienten konnten in 8% Zygomyzeten nachgewiesen werden [37]. Die Letalität der Zygomycosen bei immunsupprimierten Patienten beträgt 88 – 100% [73]. Die durch *Aspergillus* spp. und Zygomyzeten hervorgerufenen Krankheitsbilder werden im Folgenden dargestellt.

1.1 Aspergillose

Aspergillosen werden durch Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* hervorgerufen. Im Kreislauf der Natur haben Schimmelpilze die Aufgabe, abgestorbenes organisches Material wie z.B. Laub abzubauen. Dementsprechend sind diese Pilze und deren Sporen in der Umwelt weit verbreitet. Sie finden sich im Boden, auf Pflanzen und auf kompostierten organischen Abfällen und sind daher häufig sowohl in der Außen- als auch in der Raumluft, im Wasser, in Staub und in Nahrungsmitteln nachweisbar. Von mehr als 200 verschiedenen *Aspergillus*-Spezies verursachen weniger als 20 Erkrankungen beim Menschen. In den meisten Fällen werden Aspergillosen durch *A. fumigatus* (>85%) verursacht, weniger häufig durch *A. niger* (<10%),

A. terreus und *A. flavus* (<5%) oder andere Arten [69]. Die Inhalation der Sporen stellt den häufigsten Infektionsweg dar, weshalb meistens die Atmungsorgane mit betroffen sind. Entsprechend stellt die invasive pulmonale Aspergillose mit 75% die häufigste Manifestationsform der Aspergillosen dar [9]. In 5-10% tritt sie als rhinocerebrale Erkrankung auf [90]. Bei 25% der Atemwegsinfektionen durch *Aspergillus* spp. kommt es zu einer Disseminierung mit Beteiligung von Gehirn, Nieren, Gastrointestinaltrakt, Herz und/oder zu einem septischen Krankheitsbild [9]. Die pulmonale Aspergillose beginnt am häufigsten mit Fieber, das nicht auf die Gabe von Breitbandantibiotika anspricht. Bei 75% der Patienten mit Aspergillom kommt es im Verlauf zu Hämoptysen [32]. Weitere Symptome sind Brustschmerzen, Dyspnoe und Husten, also eher unspezifische klinischen Zeichen [82]. Wegen der Schwierigkeiten bei der Diagnostik gibt es Richtlinien der EORTC/MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group) anhand derer Pilzinfektionen in die Kategorien „gesichert“, „wahrscheinlich“ und „möglich“ eingeteilt werden [2]. Diese Einteilung beruht auf klinischen, radiologischen, histologischen und mikrobiologischen Befunden.

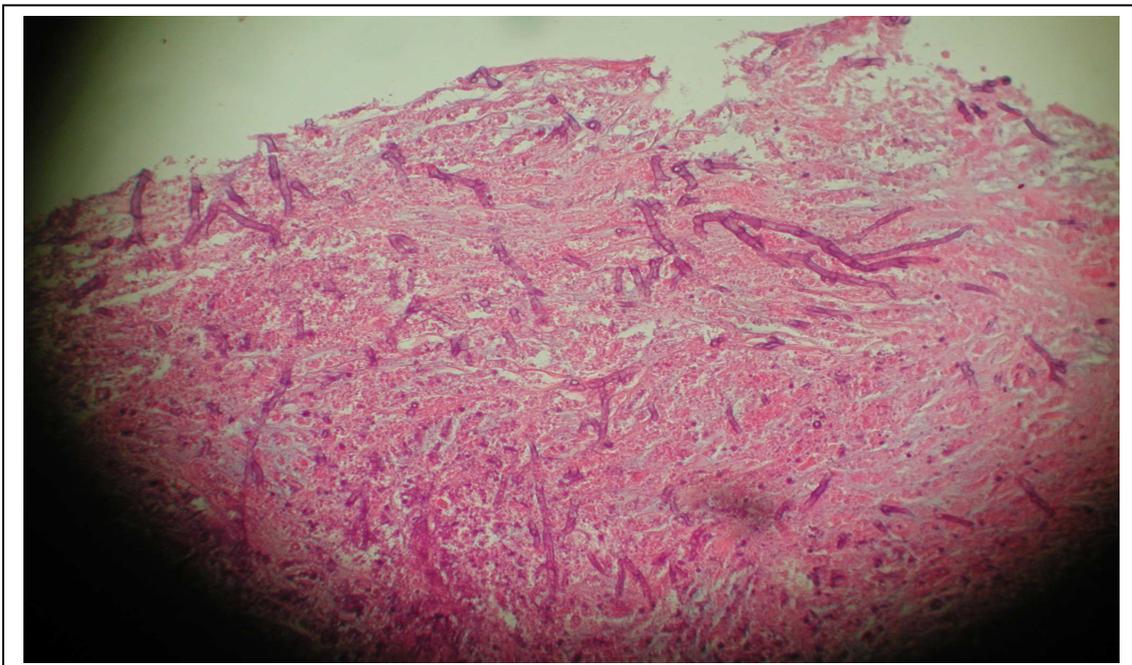


Abbildung 1: Hyphen von *Aspergillus fumigatus* mit typischer Septierung und spitzwinkligen Verzweigungen; HE-Färbung; im Original 200-fache Vergrößerung

Histopathologisch sind 7-10 µm breite, septierte Hyphen erkennbar, die sich im Winkel von ca. 45° teilen (Abb. 1), [9]. Allerdings ist eine Differenzierung innerhalb der Schimmelpilze aufgrund ähnlicher histologischer Merkmale schwierig. So z.B. zwischen *Aspergillus* spp. und *Pseudallescheria boydii*, *Fusarium* spp. oder *Penicillium* spp.. Zudem wird die histologische Diagnostik durch die teilweise geringe Probenmenge in Biopsien erschwert. Die Pilzkultur ist maximal in 50% der Fälle positiv und das Ergebnis kommt häufig zu spät für eine erfolgreiche Therapie [74]. Es wurden verschiedene serologische Methoden wie Antigennachweis aus Körperflüssigkeiten oder Nachweis *Aspergillus*-spezifischer Antikörper aus Gewebe oder Blut angewandt. Bei diesen Verfahren sind Sensitivität und Spezifität sehr variabel [29, 75]. In den letzten Jahren ist zu diesen Methoden die molekularbiologische Diagnostik mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) hinzugetreten. Je nach verwendetem Probenmaterial variieren Sensitivität und Spezifität stark. So beschreiben Lass-Flörl et al. eine Sensitivität zwischen 55 und 66% bei PCR aus Blutproben von Patienten mit gesicherter invasiver Aspergillose [48]. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass PCR-Verfahren im Nachweis von Pilzen aus betroffenem Gewebe sensitiver sind als Kultur und Histologie [53]. Allerdings hat sich diese Methodik bislang nicht als Routinediagnostik für *Aspergillus*-Infektionen durchsetzen können. Die Gründe hierfür sind u.a. darin zu sehen, dass bislang noch kein PCR-Nachweis aus Gewebeproben kommerziell erhältlich ist und dass diese DNA-Methoden unzureichend standardisiert sind, was zu einer geringen Vergleichbarkeit zwischen den Laboren führt [41, 106]. Aufgrund der genannten Probleme der Diagnosesicherung und der hohen Letalität wird entsprechend den Empfehlungen der EORTC bereits bei Verdacht eine entsprechende Therapie begonnen. Diese sollte aus drei Komponenten bestehen: Behandlung mit Antimykotika, chirurgische Therapie und, wenn möglich, Verbesserung der Immunität des Patienten [69]. Neben dem nebenwirkungsreichen Amphotericin B werden neuere Azolderivate wie Voriconazol und Itraconazol sowie Echinocandine, wie Caspofungin, erfolgreich eingesetzt [17, 22, 30, 58]. Da verschiedene *Aspergillus*-Arten unterschiedliche Sensibilitäten gegenüber Antimykotika aufweisen, kommt der

Speziesidentifizierung eine zunehmende Bedeutung zu. Es zeigte sich, dass Infektionen durch *A. terreus* weitaus weniger gut auf die Therapie mit Amphotericin B ansprechen als *A. fumigatus* [102].

1.2 Zygomycose

Zygomycosen (Mucormycosen) werden durch Pilze verursacht, die in der Ordnung *Mucorales* zusammengefasst werden und zu den Gattungen *Rhizopus*, *Absidia*, *Apophysomyces*, *Cunninghamella* und *Saksenaea* gehören [68]. Wie *Aspergillus* spp. sind auch Zygomyzeten in der Umwelt ubiquitär vorhanden. Es wird angenommen, dass die Infektion durch die Inhalation von Sporen in die paranasalen Sinus eines prädisponierten Empfängers ausgelöst wird. Gesunde Individuen weisen eine hohe natürliche Immunität gegenüber Zygomyzeten auf, so dass es nur vereinzelte Berichte über rhinozerebrale Mucormycose in Abwesenheit jeglicher Risikofaktoren gibt [37, 67, 79]. Prädispositionsfaktoren sind Diabetes mellitus mit Ketoazidose, Immunsuppression durch Malignome, Chemotherapie, Neutropenie, Corticosteroidbehandlung und Mangelernährung [42, 64, 66]. Außerdem können Zygomycosen unter Therapie mit Breitspektrumantibiotika oder Desferoxaminen beobachtet werden [66]. Neben pulmonalen, gastrointestinalen, renalen und kutanen Infektionen stellt die rhinozerebrale Mucormycose mit einem Anteil von 30 bis 50% aller durch Zygomyzeten verursachten Erkrankungen, die häufigste Form dar. Es wurden Hypersensitivitätsreaktionen in Form von allergisch pulmonalen Erkrankungen bei Immunkompetenten gesehen [33]. Durch die Fähigkeit der Zygomyzeten zur Angioinvasion kommt es im betroffenen Gewebe zur Thrombose, Infarzierung und Nekrose [62, 68]. In der Folge kann sich eine disseminierte Zygomycose entwickeln, deren Letalität mit 96% beziffert wird [92]. Klinisch manifestiert sich die rhinozerebrale Form zunächst mit den Zeichen einer Sinusitis mit Schmerzen, Schwellung und Fieber. Die Erkrankung schreitet rasch voran und breitet sich auf benachbarte Strukturen aus. Im Verlauf kann es zu periorbitalem Ödem, Exophthalmus, Hirnnervenbeteiligung, Disseminierung ins ZNS und Erblindung kommen. Die pulmonale Form der Zygomycose präsentiert sich mit

weniger spezifischen Symptomen wie Fieber, Husten, Hämoptysen und Pleuraschmerzen. In einer großen Studie konnte nur in 44% der Fälle prä mortal die Diagnose „pulmonale Zygomycose“ gestellt werden [92]. Wegen des rapiden und destruierenden Krankheitsverlaufs ist eine umgehende Diagnosestellung essenziell. Zurzeit stützt sich die Diagnose v.a. auf die Kultur und Mikroskopie von Untersuchungsmaterialien. Allerdings weisen beide Verfahren eine geringe diagnostische Sensitivität auf [70]. Greenberg et al. beschreiben, dass in der Kultur aus autopsischem Gewebe mit histologisch gesichertem Nachweis von Zygomyzeten in nur 52% der Fälle eine Pilzinfektion nachgewiesen werden konnte. Zudem scheint die Sensitivität bei der histologischen und kulturellen Untersuchung noch geringer zu sein, wenn anstatt Gewebebiopsien BAL-Flüssigkeit (Bronchoalveoläre Lavage) verwendet wird [37].

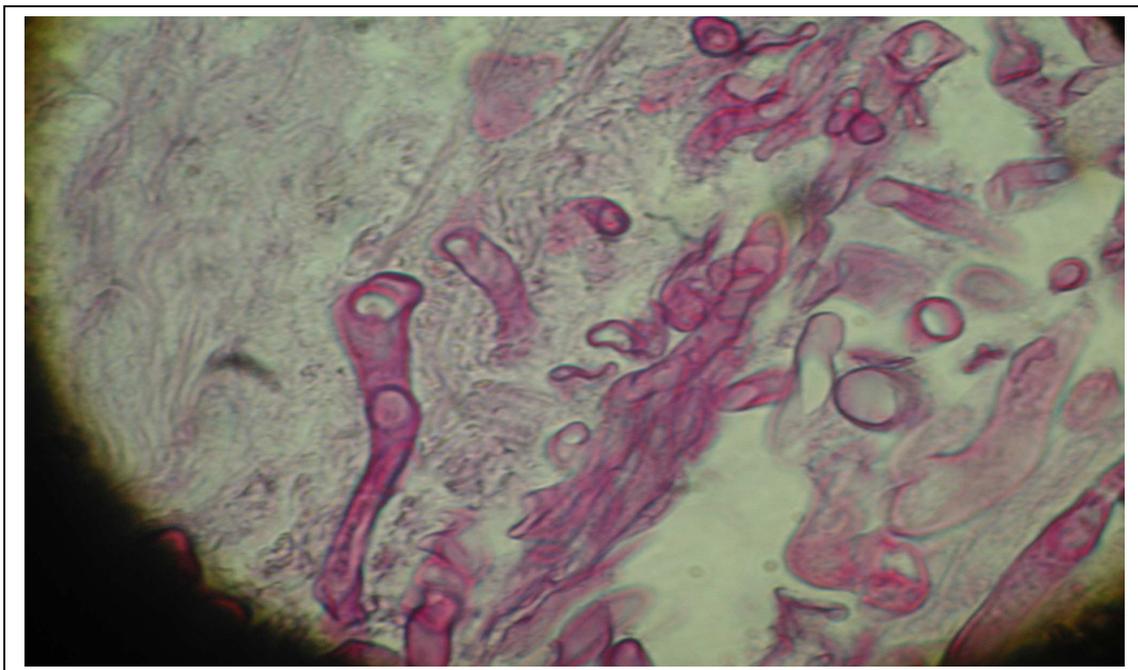


Abbildung 2: Hyphen von Zygomyzeten; typisch die fehlende Septierung, variable Hyphenbreite sowie rechtwinkelige Verzweigungen, die als Verdickungen (kreisrunde oder ovale Aussparungen der gefärbten Hyphen) erkennbar sind; PAS-Färbung; Originalvergrößerung 1000-fach.

Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, lassen sich die Pilze histopathologisch durch ihre charakteristischen 5 bis 15 μm unregelmäßig breiten, nicht septierten

Hyphen mit rechtwinkligen Abzweigungen erkennen [68]. Dennoch ist es in vielen Fällen nicht möglich, die Hyphen darzustellen; so z.B. bei geringen Probenmengen oder wenn die Biopsie aus umgebendem Gewebe und nicht direkt aus dem Infektionsherd stammt [70]. Auch die Pilzkultur ist unzuverlässig. Es wurden nur wenige molekularbiologischen Methoden zur Diagnostik der Zygomycose publiziert: Einsele et al. identifizieren mittels PCR mit Zielsequenz in der variablen Region der 18S rDNA Zygomyceten, *Aspergillus* spp., *Candida* spp. und *Fusarium* spp. mittels Hybridisierungssonden [25]. Mit Hilfe der 18S rDNA-PCR von Walsh et al. gelang der Nachweis von DNA von *Rhizopus* spp. v.a. aus Körperflüssigkeiten, wie Blut, Sputum, BAL [99]. In einer Studie der Mayo Klinik, die ein kommerziell erhältliches System zur Identifizierung von Pilzen anhand ribosomaler DNA (MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA) testete, konnte in lediglich 35% der Proben, die Zygomyceten enthielten, DNA amplifiziert werden [38]. Therapeutisch ist die frühzeitige radikale chirurgische Intervention neben der hochdosierten Gabe von Amphotericin B ein wichtiges Element [68, 92]. Zygomyceten weisen in vitro eine Resistenz gegen Voriconazol und Caspofungin auf, so dass die Differenzierung zwischen Aspergillose und Zygomycose für eine effektive antimykotische Therapie bedeutsam ist [33]. Die Prognose der Zygomycose ist schlecht: Bei Patienten mit Neutropenie beträgt die Letalität 75-80%.

Bei den durch *Aspergillus* spp. und Zygomyceten hervorgerufenen Erkrankungen bestehen in Bezug auf Risikopopulation, klinische Manifestation, histopathologischen Befund und Letalität viele Übereinstimmungen. Da sich aber die einzelnen Pilzgattungen hinsichtlich ihrer Sensitivität auf Antimykotika deutlich voneinander unterscheiden, ist die Erregeridentifizierung von herausragender Bedeutung für eine erfolgreiche Therapie.

1.3 Pilzinfektionen der Nase und Nasennebenhöhlen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der Differenzierung von Aspergillen und Zygomyceten aus humanen Gewebeproben. Da die Atemwege die Haupteintrittspforte dieser Pilze in den menschlichen Körper darstellen eignet sich Material aus diesem Bereich. Für diese Arbeit wurden Biopsien aus

humanen Nasennebenhöhlen verwendet, in denen sich histologisch sog. Pilzbälle, eine spezielle Form der fungalen Sinusitis, darstellen.

Mit **Pilzball** bzw. „**fungus ball**“ (Mycetom oder Aspergillom) wird eine chronische, nicht-invasive Form der Rhinosinusitis bezeichnet. Es scheint die häufigste Form der fungalen Sinusitis in Europa zu sein [86]. Hiervon betroffen sind vorwiegend immunkompetente nicht-atopische Patienten. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung mit den Symptomen einer chronischen Sinusitis: Langwierige nasale Obstruktion, purulentes, teilweise kieselsteinartiges Nasensekret sowie Kopf- oder Gesichtsschmerzen sind charakteristisch [23]. Manche Patienten sind beschwerdefrei. Die Symptome sind meist unilateral, häufig ist ein Sinus maxillaris betroffen [60]. Der Pilzball besteht aus einer dicht gepackten Masse konzentrisch angeordneter Hyphen mit häufig lehmartigem Aussehen [59].

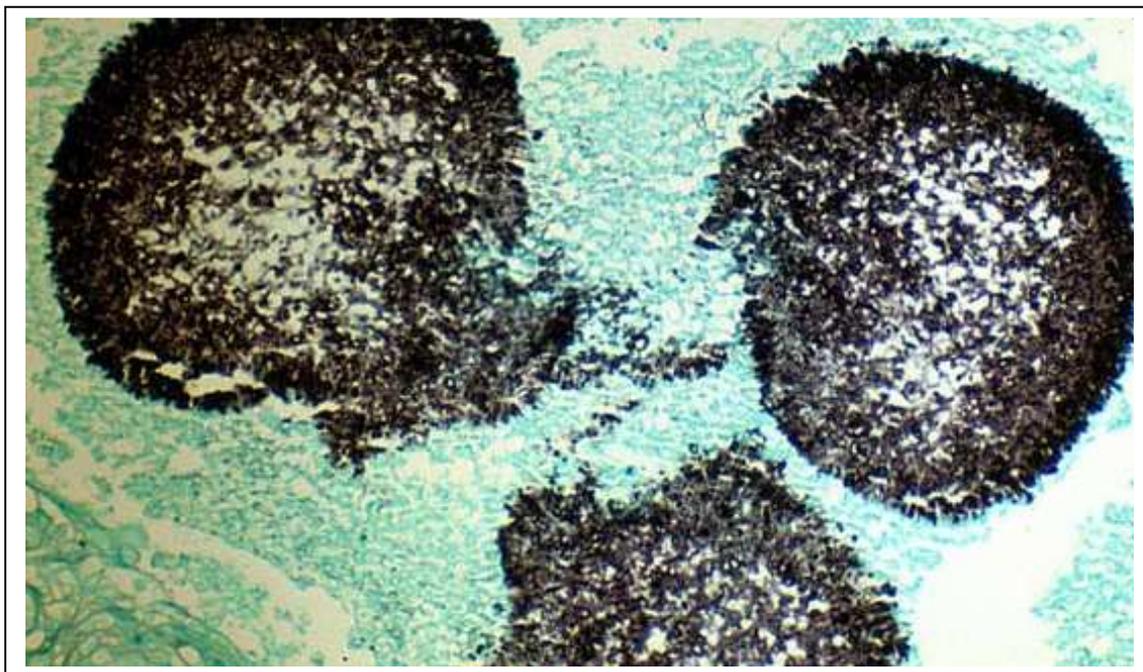


Abbildung 3: Darstellung eines „fungus balls“ aus einem Lungenpräparat; Versilberung nach Grocott (GMS-Reaktion)

Histologisch ist eine geringe chronische Entzündungsreaktion des betroffenen Sinus zu sehen. Gewebe- oder Knocheninvasivität besteht nicht [23]. Verursacher des Pilzballs ist am häufigsten *A. fumigatus* [86]. Im CT ist oft eine

partielle oder komplette Obstruktion des betroffenen Sinus zu erkennen. Teilweise finden sich Sklerosierungen des umgebenden Knochens und Kalzifikationen im Bereich der Schleimhaut [8, 69]. Die Pathogenese des Mycetoms ist unklar. Teilweise ist eine Assoziation zu Nasenpolypen und hypertropher Rhinosinusitis erkennbar, häufig kann jedoch keine zugrunde liegende Erkrankung ausgemacht werden [23]. Differenzialdiagnostisch ist an bakterielle Sinusitis, Tuberkulose, Lues, Osteomyelitis und Wegener Granulomatose zu denken [7].

Neben den Pilzbällen existieren weitere pilzbedingte Sinusitiden, namentlich: (1) Akute/fulminante (invasive), (2) chronische (invasive) und (3) granulomatöse (indolent) invasive Form sowie die (4) allergische Sinusitis. Da Prognose und Behandlung der fungalen Sinusitiden verschieden sind, ist die exakte Zuordnung von Bedeutung [36, 59].

Die **Akut fulminante Rhinosinusitis** ist eine rapid progressive Erkrankung, die vornehmlich bei Patienten mit schlecht eingestelltem Diabetes mellitus (insbesondere mit Ketoazidose) und bei Immunsuppression auftritt. Ein Bericht über 179 Patienten mit rhinozerebraler Mucormykose zeigte, dass 126 Patienten (70%) an Diabetes mellitus litten und sich in einer ketoazidotischen Stoffwechsellage befanden [55]. Als verursachende Erreger der akut fulminanten Rhinosinusitis konnten Pilze der Ordnung *Mucoraceae*, sowie *Aspergillus*-Spezies, insbesondere *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. niger*, identifiziert werden [59]. In der histologischen Untersuchung sind gewebs- und gefäßinvasive Hyphen zu erkennen. Dieser Angiotropismus führt klinisch zu einer Vaskulitis mit Thrombose und Infarzierung des lokalen Gewebes und Infiltration des Knochens, aber auch zu Blutungen. Klinisch manifestiert sich sie akute Sinusitis mit Fieber, Nasenbluten, behinderter Nasenatmung, Sehverschlechterung und Gesichtsschmerz.

Die **Chronisch invasive Pilzsinusitis** ist weniger aggressiv als die akut fulminante Verlaufsform. Aber auch hier sind fast ausschließlich immunkompromittierte Patienten betroffen. *A. fumigatus* ist die am häufigsten

identifizierte Pilzspezies [80]. Histopathologisch zeigen sich ebenfalls Gewebsnekrose, chronische Entzündungsinfiltrate und invasiv wachsende Pilzhyphen. Aufgrund der Neigung zu Rezidiven ist die Prognose schlecht [80, 81].

Patienten mit **Granulomatös invasiver Pilzsinusitis** sind in der Regel immunkompetent. Typischerweise ist nur ein Sinus betroffen. Häufig werden die Patienten mit chronisch hypertropher Rhinosinusitis mit saisonal entzündlichen Infiltraten und Polypen vorgestellt. Histopathologisch ist eine superfizielle Mikroinvasion der Mukosa durch Pilzhyphen erkennbar. Diese werden von sog. Riesenzellen umgeben, sodass sich das Bild eines Granuloms ergibt. Blutgefäße und Knochen werden nicht infiltriert [80].

Bei immunkompetenten Personen mit Atopie-Anamnese kommt die **Allergische Pilzsinusitis** als IgE-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion (Typ I nach Coombs und Gell) auf Pilzantigene vor. In 75% der Fälle sind ubiquitär vorkommenden „Schwärzepilze“ der Gattungen *Bipolaris*, *Curvularia* und *Alternaria* verantwortlich. *Aspergillus*-Spezies verursachen nur 10 bis 20% aller allergischen Sinusitiden [23, 24, 97]. Bei der Mehrzahl der Patienten besteht eine langjährige Anamnese mit Schleimhautschwellungen, Polyposis nasi, Septumdeviationen, Asthma bronchiale und chronischer Sinusitis, die nicht auf die Behandlung mit Antibiotika, Antihistaminika oder Kortikosteroiden ansprechen [56, 59]. Die betroffenen Sinus sind mit entzündlich-allergisch muzinösen Material gefüllt. Mikroskopisch findet sich nekrotisches Gewebe und eine Eosinophilie [35].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war der Vergleich einer PCR mit Zielsequenz in der mitochondrialen DNA von *Aspergillus spp.* mit einer universellen PCR, deren Zielsequenz in der fungalen 28S rDNA liegt. Die verwendeten Proben waren zuvor histologisch und mittels 28s rDNA-PCR untersucht worden und wurden verblindet zur Verfügung gestellt. Da die Proben aus den Atemwegen (Sinus)

stammen, die möglicherweise mit Zygomyceten kolonisiert sein können, war ein weiteres Ziel, die Spezifität einer zuvor etablierten PCR zum Nachweis einer Teilsequenz der 18S rDNA von Zygomyceten weiter zu evaluieren. Als drittes Ziel wurde die Spezifität und Sensitivität der Aspergillus-PCR anhand von extrahierter DNA von non-fumigatus Aspergillus-Stämmen und anderen Pilzspezies untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Geräte

2.1.1 Kommerziell erhältliche Kits

ABI PRISM® Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA
Centri-Sep® Spin Columns	Princeton Separations Inc., Adelphia, USA
Perkin Elmer AmpliTaq® DNA-Kit	Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA
QIAamp® DNA Mini Kit 250	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit 250	Qiagen, Hilden

2.1.2 Enzyme und Chemikalien

Agarose NEEO® Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Desoxynukleosid-Triphosphat Set (100 mM each dNTP)	Promega, Madison, WI., USA
DNA Molekulargewichtsmarker VIII 100 bp DNA-Leiter, äquimolar	Boehringer, Mannheim Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fisch-DNA	Sigma, Deisenhofen
LiChrosolv®	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Meliseptol® Braun	Braun, Melsungen
Oligonukleotide, Sequenzierstandard	Roth, Karlsruhe
Oligonukleotide:	
ZM 1, ZM 2, ZM 3	Roth, Karlsruhe
AM 1, AM 2, AM 3	Roth, Karlsruhe
G 1, G 2	Roth, Karlsruhe

GAP 1, GAP 2, GAP 3, GAP 4	Roth, Karlsruhe
Parafilm PM 996	Pechiney, Neenah
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.3 Pufferrezepturen

Agarosegel - Ladepuffer:

10x Stocklösung:

250 mg	Bromphenolbraun
60 ml	Glycerin
33 ml	Trizma base pH 7,6 (150mM)
7 ml	H ₂ O _{bidest}

Zu 100 µl dieser Lösung wurden 450 µl Glycerin und 450 µl H₂O_{bidest} gegeben, um den verwendete Ladepuffer zu erhalten.

50x TAE-Puffer:

2,0 M	Tris, pH 8,0
1,0 M	Eisessig
0,5 m	EDTA ad Aqua

2.1.4 Geräte

Autoklav:

Varioklav [®] Dampfsterilisator Typ 400	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
--------------------------------------------------	-------------------------------------------

Gefäße:

Reaktionsgefäßklemmständer	Eigenbau
----------------------------	----------

Gelkammern:

Jeweils 2 x 10 Taschen	MWG Biotech, Eberberg
MWG Biotech	MWG Biotech, Eberberg
Peqlab Model 40-0708	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Stratagene	Sratagene, Cedar Creek, TX, USA
Heizplatte:	
Ikamaq® RH	IKA Works, Wilmington, USA
Kamera:	
CCD Video Camera Module	
RA1- Kameravorrichtung	Firma Haiser, Deutschland
BioCapt PC-Programm	
Mitsubishi P90 Drucker	
Küvetten:	
UVette® 220 – 1600 nm	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotom:	
Mikrotom	R. Jung, Heidelberg
PCR-Geräte:	
Primus 96 plus Thermocycler	MWG Biotech, Ebersberg
Primus 96 advanced Thermocycler	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Photometer:	
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten:	
Carl Roth Pipetten	Roth, Karlsruhe
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Biohit Proline	Biohit Plc. Headquarters, Helsinki, Finland
Sequenziergerät:	
373 Automated DNA Sequencer	Applied Biosystems,
ABI Genetic Analyser 3100	Perkin Elmer, Foster City, USA
SpeedVac:	
Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Schüttler:	
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

Sterilwerkbank:

LaminarFlow

Kendro, Ashville, USA

UV-Schirm:

Vilber Lourmat

France

Vortexgerät:

MS 1 Minishaker IKA®

IKA-Works, Wilmington, USA

VF 2

IKA-Labortechnik

Waage:

Mettler PM 4000 Waage

Mettler Toledo, Columbus, USA

Zentrifugen:

Biofuge 13

Heraeus Sepatech, Hanau

CR 4 22

Jouan, Saint Mazaire,

Frankreich

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen:

Biozyme budgetline® SafeSeal-Tips

Biozyme, Hessisch Oldendorf

1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl

Reaktionsgefäße:

Safe Lock Tubes 1,5 ml; 2 ml

Eppendorf, Hamburg

Micro Tubes 0,5 ml

Sarstedt AG&Co., Numbrecht

2.2 Untersuchungsmaterial

2.2.1 Paraffin-eingebettete Gewebeproben/ „fungus balls“

Insgesamt wurden 81 in Paraffin eingebettete Gewebeproben untersucht. Diese waren Biopsien aus humanen Sinus maxillaris. Histopathologisch zeigten sich so genannte „fungus balls“ (Pilzbälle). Alle Proben wurden anonymisiert und kodiert zugesandt, ohne Verbindung zu Patientendaten, die für die Fragestellung nicht relevant waren. Alle 81 Proben waren bereits durch das Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Wien untersucht worden.

Die dortigen Ergebnisse wurden nach Beendigung der Bearbeitung zu Vergleichszwecken von Frau Prof. Willinger zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Aspergillus-PCR mit verschiedenen Pilz-Spezies

Es wurden Laborstämme von *A. niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus* und *A. flavus* von Frau Prof. Willinger bereitgestellt. Diese wurden nach üblichen Methoden angezüchtet, identifiziert und als Konidien suspensionen zugesandt. Folgende *Candida*-Stämmen wurden verwendet: *C. dubliensis* (Laborstamm USA, klinisches Isolat), *C. tropicalis* (DSM 11953), *C. albicans* (DSM 11948) sowie *C. glabrata* (DSM 11226). Bei den Stämmen von *Histoplasma capsulatum* und *Coccidioides immitis* handelte es sich um klinische Isolate aus dem Labor von Frau Dr. G. Gonzalez in Monterrey, Mexiko.

2.2.3 Identifizierung von Aspergillus-Stämmen

Es wurden 17 verblindete und kodierte Konidien-Suspensionen von *Aspergillus*-Stämmen verwendet, die aus dem Labor von Frau Prof. Dr. Willinger in Wien zur Verfügung gestellt wurden. Nach Ermittlung der PCR-Ergebnisse wurden die Proben zum Vergleich entblindet.

2.2.4 Ringversuch

Es wurden 50 kodierte Proben untersucht. Diese enthielten entweder Extrakte von *Aspergillus*-DNA in unterschiedlicher Konzentration oder ausschließlich steriles Wasser. Vorgabe zur Untersuchung der Proben war, dass jedes der insgesamt sechs teilnehmenden Zentren mit dem im eigenen Labor eingesetzten PCR-Protokoll nachweisen sollte, ob sich *Aspergillus*-spezifische DNA in der Probe befindet. Sofern möglich, sollte zusätzlich die *Aspergillus*-Spezies identifiziert werden.

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion

DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten

Mit dem Mikrotom wurden von jedem Gewebeblock 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Vor dem ersten Schnitt und nach jedem Block wurde das Schneidmesser des Mikrotoms und die anderen Instrumente wie Pinzette mit Xylol gereinigt. Mindestens zwei bis maximal vier dieser Schnitte wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle weiteren Arbeitsschritte unter der LaminarFlow durchgeführt. Es wurde das QIAamp®-Mini-Kit von Qiagen zur DNA-Extraktion verwendet. Zur Entparaffinierung wurden 1000 µl Xylol zu den Schnitten pipettiert. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße 5 min bei Raumtemperatur im Thermoshaker geschüttelt. Nach dreiminütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Zur Entfernung des restlichen Paraffins wurde diese Xylolbehandlung wiederholt. Zur Entfernung des restlichen Xylols wurden 1000 µl Ethanol zugefügt, die Suspension 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Waschvorgang mit Ethanol wurde wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zum vollständigen Trocknen in die Vakuum-Zentrifuge gestellt. Nach kompletter Trocknung wurden nach Vorgaben des Herstellers 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Endkonzentration ca. 2 mg/ml) zugegeben und der Inhalt der Eppendorf Gefäße bei 56°C und 900 rpm über Nacht im Wärmeschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Wasserbad auf 100°C erhitzt und das inzwischen lysierte Gewebesediment 5 min mit Hilfe eines eigens dafür hergestellten Reaktionsgefäßklemmständers zunächst im Wasser gekocht. Anschließend wurde der mit Proben bestückte Klemmständer in Flüssigstickstoff (sog. Stickstoffbehandlung) getaucht. Das Einfrieren in Flüssigstickstoff wurde insgesamt dreimal durchgeführt, zwei Mal von einem dreiminütigem und beim letzten Mal von einem fünfminütigem Kochen gefolgt.

Das wiederholte Kochen und Einfrieren dient dem Aufbrechen der Pilzzellwände [6].

Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer wurden die Proben geschüttelt und für 10 Minuten bei 70°C auf dem Thermoschüttler inkubiert, um dann 200 µl Ethanol zuzufügen. Nach Durchmischen des Extraktionsansatzes wurde die gesamte Suspension auf eine Silikasäule aufgetragen und bei 8000 rpm zentrifugiert. Dann wurde das mit der Suspension befüllte Qiagen Silikasäulchen vom Auffanggefäß getrennt und die Säule in ein neues 2 ml Auffangröhrchen gestellt, das Auffanggefäß mit Filtrat wurde verworfen. Gemäß Herstellerangaben wurden 500 µl AW1-Puffer aufgetragen, die Proben zentrifugiert (eine Minute, 8000 rpm). Dann wurde das erhaltene Filtrat verworfen und 500 µl AW 2-Puffer auf die Säule gegeben. Auch das letzte Auffanggefäß wurde nach dem Zentrifugieren verworfen und die Silikasäule mit daran gebundener DNA in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt. Zum Lösen der DNA von der Silikasäule wurden 50 µl AE-Puffer auf die Säule pipettiert. Nach Einwirken des Eluationspuffers wurde die Silikasäule im Eppendorfgefäß für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Auswaschvorgang mit 50 µl AE-Puffer wurde wiederholt. Das insgesamt 100 µl fassende Extraktionsprodukt mit der gelösten DNA wurde bis zum Ansatz der verschiedenen PCRs bei 4-6°C im Kühlschrank aufbewahrt oder bei -20°C portioniert und eingefroren.

DNA-Extraktion aus Pilzsuspensionen

Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die die Pilzsuspensionen enthaltenden und mit Parafilm verschlossenen Reaktionsgefäße unter der LaminarFlow vorsichtig geöffnet und 200 µl deren Inhalts in 1,5 ml Eppendorf Gefäße pipettiert. Pro Suspension wurden mindestens zwei Extraktionsansätze mit identischen Mengen angesetzt. Zu den Suspensionen wurden dann 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) gegeben. Die weitere Extraktion wurde wie beschrieben durchgeführt.

2.3.2 Amplifikation Zygomyceten-spezifischer DNA

Die Zielsequenz der Zygomyceten-PCR ist die 18S Untereinheit der ribosomalen DNA. Die Region unterscheidet sich deutlich von der 18S rDNA von *Aspergillus*-Arten, ist aber innerhalb der Gruppe der Erreger von Mucormykosen konserviert. Das Primerpaar ZM1: 5´-ATT ACC ATG AGC AAA TCA GA-3` und ZM 2: 5´-TCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT C-3` amplifiziert ein 407 bis 408 bp langes Fragment. ZM 1 und ZM 2 sind den Positionen 722 – 741 und 1129 –1108 der 18S rDNA von *Cunninghamella* spp. (GenBank accession number AF 113421) komplementär. Bei der nested-PCR wird durch ZM 1 und ZM 3: 5´-CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT AG-3` ein 176 bis 177 bp langes Fragment des ersten Produktes begrenzt. ZM 3 ist zu den Positionen 898 – 876 der 18 S rDNA von *Cunninghamella* spp. komplementär [6].

Zygomyceten-PCR

Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl, bestehend aus 10 µl DNA-Extrakt und 40 µl Reaktionsmix, hat eine Endkonzentration von 10 mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM KCL, 2,5 mM MgCl₂ (10 x Perkin Elmer Puffer II plus MgCl₂-Lösung), 1 µM von jedem der Primer ZM 1/ ZM 2 , 1,5 U AmpliTaq DNA Polymerase und 100 µM der einzelnen Desoxynukleosidtriphosphate. Weitere Informationen zum Reaktionsmix und zum Temperaturprofil der Reaktion sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt. Diese und alle folgenden PCRs wurden mit dem Cycler Primus 96 Plus oder Primus 96 Advanced durchgeführt. Nach fünfminütigem Schmelzen der DNA-Doppelstränge bei 94°C, dem sog. Pretreatment, wurden 35 Zyklen mit den jeweiligen Reaktionsstufen Denaturierung (94°C für 30 sek), Annealing der Primer (50°C für 30 sek) und DNA-Synthese (72°C für 60 sek) durchgeführt. Mit Posttreatment wird die abschließende Elongation über 5 min bei 72°C bezeichnet. Anschließend kühlte der Thermocycler auf 4°C ab. Diese Temperatur wurde bis zur Probenentnahme konstant gehalten.

Tabelle 1: Reaktionsansatz der Zygomyceten- und Aspergillus-PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H ₂ O _{Amp}	28,2 µl	
10 x Puffer	5 µl	10 mM Tris-HCl ; 50 mM KCl
MgCl ₂ -Lsg.	5 µl	2,5 mM
Primer ZM 1/AM 1	0,5 µl	1 µM
Primer ZM 2/ AM 2	0,5 µl	1 µM
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM dNTP
AmpliTaq	0,3 µl	1,5 U
DNA-Extrakt	10 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 2: Temperaturprofil der Zygomyceten- und Aspergillus-PCRs

DNA-Denaturierung	94°C für 5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C für 30 sek	
Annealing	50°C für 30 sek	
DNA-Synthese	72°C für 60 sek	
Elongation	72°C für 5 min	

Zygomyceten-spezifische nested-PCR

Der Reaktionsansatz der nested-PCR entspricht im Wesentlichen dem der ersten PCR. Beim Gesamtvolumen von 50 µl wurde 1 µl des ersten PCR-Produktes zugegeben und beim Reaktionsansatz wurden 37,2 µl H₂O_{Amp} anstatt 28,2 µl verwendet. Die Details sind in Tabelle 3 dargestellt. Das PCR-Programm entsprach dem der ersten PCR (siehe Tabelle 2).

Tabelle 3: Reaktionsansatz der Zygomyceten- und *Aspergillus* nested-PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H ₂ O _{Amp}	37,2 µl	
10 x Puffer	5 µl	10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl
MgCl ₂ -Lsg.	5 µl	2,5 mM
Primer ZM 1 /AM 1	0,5 µl	1 µM
Primer ZM 3/ AM 3	0,5 µl	1 µM
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM dNTP
AmpliTaq	0,3 µl	1,5 U
Produkt der vorherigen PCR	1 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

2.3.3 *Aspergillus*- spezifische-PCR

Diese PCR dient dem Nachweis mitochondrialer *Aspergillus*-DNA. Mit den Primern AM 1: 5'-CTT TGG TTG CGG GTT TAG GGA TT-3' und AM 2: 5'-GGG AGT TCA AAT CTC CCT TGG G-3' wird ein 201 bp langes Fragment der mitochondrialen DNA von *Aspergillus fumigatus* amplifiziert [6]. Die Primer sind komplementär zu den Positionen 938 – 916 (AM 1) und zu 738 – 759 (AM 2) der GenBank Sequenz (accession number L37095). Zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität wurde eine semi-nested PCR angeschlossen. Dazu wurden die Primer AM 1 und AM 3 verwendet. AM 3 mit 5'-GAA AGG TCA GGT GTT CGA GTC AC-3' ist der Position 804 -826 komplementär. Zusammen mit AM 1 wurde das in der ersten PCR entstandene 201 bp lange Fragment auf nunmehr 135 bp begrenzt. Für den PCR-Ansatz wurden 40 µl Reaktionsmix und 10 µl Proben-DNA verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsmix entsprach mit Ausnahme der Primer dem der Zygomyceten-PCR (Tabelle 1).

Aspergillus- spezifische nested-PCR

AM 1 und AM 3 amplifizieren ein 135 bp langes Produkt [10]. Der Reaktionsansatz hatte eine Endkonzentrationen von 10 mM Tris-HCl, 50 mM

KCl, 2,5 mM MgCl₂ (10 x Perkin Elmer Puffer plus MgCl₂-Lösung), 1 µM von jedem Primer AM 1/AM 3, 1,5 U AmpliTaq-DNA-Polymerase, 100 µM jedes Desoxynukleosidtriphosphats. Dazu wurde 1 µl des ersten PCR-Produkts pipettiert. Reagenzien und Volumina entsprachen mit Ausnahme der Primer dem Ansatz der Zygomyceten nested PCR. Das PCR-Programm stimmte mit dem der ersten PCR überein (siehe Tabelle 2).

Tabelle 4: Verwendete Primer der Zygomyceten- und Aspergillus- PCRs

Primer	Sequenz (5'-3')	GenBank(a.n.)*	Position
ZM 1	ATT ACC ATG AGC AAA TCA GA	AF 113421	722 - 741
ZM 2	TCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT C	AF 113421	1129 - 1108
ZM 3	CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT AG	AF 113421	898 - 876
AM 1	CTT TGG TTG CGG GTT TAG GGA TT	L37095	938 - 916
AM 2	GGG AGT TCA AAT CTC CCT TGG G	L37095	738 - 759
AM 3	GAA AGG TCA GGT GTT CGA GTC AC	L37095	804 - 826

*GenBank accession number

2.3.4 Gelelektrophorese der Amplifikate

Die Amplifikate wurden in einem 1,75 %-igem Agarosegel aufgetrennt. Zum Herstellen eines Geles wurden in einem Erlenmeyerkolben 0,7 g Agarose 40 ml 1x TAE-Puffer zugefügt und bis zum vollständigen Lösen aufgeköcht. Der unter 60°C abgekühlten, noch flüssigen Agarose, wurden 3 µl Ethidiumbromid (Konzentration: 0,1% in H₂O_{Amp}) zugesetzt und die Agarose in die vorbereiteten Gelkammern, die Schablonen für die Geltaschen enthielten, gegossen. Nach mindestens 20 minütigem Polymerisieren wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x TAE-Puffer übergossen, sodass das Gel vollständig mit Pufferlösung bedeckt war.

Auf Parafilm wurden 10 µl des nested-Amplifikates mit 5 µl Ladepuffer vermischt und 10 µl des Gemisches in eine Geltasche pipettiert. Zur Fragmentlängenbestimmung wurden 5 µl der 100 bp DNA-Leiter jeweils in die erste Tasche einer Reihe im Gel aufgetragen. Die Laufzeit betrug bei einer

Spannung von 100 Volt ca. 35 min. Die Gele wurden aus der Elektrophoresekammer entnommen, unter UV-Licht ausgewertet und mittels digitaler Video-Fotoanlage dokumentiert.

2.3.5 Kontrollen

Maßnahmen zur Qualitätssicherung und Kontaminationskontrolle

Die Arbeitsschritte Extraktion, Reaktionsmixansatz, Probenzugabe und Gellauf wurden, entsprechend den Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (MiQ) für diagnostische PCR-Verfahren der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM; Roth et al., 1997), räumlich getrennt und mit stationären Arbeitsgeräten (z. B. Pipettensätze) durchgeführt. Sämtliche im Rahmen der Extraktion verwendete Puffer wurden an einem Reinarbeitsplatz in kleinen Mengen (1,5-2 ml) in autoklavierte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Verhaltensempfehlungen zum Arbeiten an Sterilbänken wurden beachtet und es wurden ausschließlich kommerziell abgepackte gestopfte Einmal-Pipettenspitzen verwendet.

Extraktionskontrollen

Bei jeder Extraktion wurden von Anfang an Kontrollen mitgeführt. Diese Eppendorfgefäße hatten die gleiche Größe und enthielten anstelle einer Probe 200 µl sterile 0,9%ige Natriumchloridlösung. Die Kontrollen waren nach dem ersten Reaktionsschritt äußerlich nicht von den anderen Proben zu unterscheiden, sie nahmen wie diese an jedem Reaktionsschritt und an jeder Inkubation teil. Das Eluat von den Silikasäulen wurde in den PCRs und folgenden nested-PCRs mit anschließender Gelelektrophorese zur Kontrolle von Kontaminationen während der Extraktion mitgeführt.

PCR und nested-PCR

Jede PCR wurde nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden sämtliche PCR-Reagenzien initial an einem Reinarbeitsplatz in zuvor autoklavierte Eppendorfgefäße in kleinere Mengen aufgeteilt. Für jeden Ansatz wurden Eppendorfgefäße mit aliquotierten

Reagenzien geöffnet und eventuelle Restvolumina verworfen. Es wurden auch hier ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen und getrennte Pipettensätze für DNA und übrige Reagenzien verwendet. Zudem wurden die einzelnen Schritte wie Ansetzen des Reaktionsmixes, Zugabe der Positivkontrolle, PCR und Darstellung des PCR-Produkts im Gel an räumlich getrennten Arbeitsplätzen vorgenommen.

Positivkontrolle

Klonierte Plasmid DNA von *Aspergillus fumigatus* (Konzentration 10 fg/ μ l) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Zum Reaktionsansatz wurden 10 μ l der klonierten DNA anstelle von Proben-DNA gegeben. Die Positivkontrolle diente dem Nachweis optimaler Reaktionsbedingungen.

Negativkontrolle

Als Negativkontrolle wurden 10 μ l humane Leukozyten-DNA anstelle von Proben-DNA eingesetzt. Die Negativkontrolle wurde durchgeführt, um mögliche Kreuzkontaminationen während des Pipettierens und unspezifischer PCR-Produkte zu entdecken.

Leerwert

Der Leerwert wurde zur Kontrolle möglicher unspezifischer Amplifikationen der Reaktionspartner und Kreuzkontaminationen insbesondere bei der nested PCR mitgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt dazu statt DNA 10 μ l H₂O_{Amp}. Der Reaktionsmix der nested-PCR wurde ebenfalls mit einem Leerwert überprüft. Es wurde 1 μ l H₂O_{Amp} anstelle von 1 μ l des ersten PCR-Produktes zupipettiert.

Inhibitorkontrollen

Zum Ausschluß von PCR-Inhibitoren als Ursache eines negativen PCR-Ergebnisses wurden bei jedem negativen Ergebnis in einem zweiten PCR-Ansatz 8 μ l Probe mit 2 μ l der Positivkontrolle vermischt. Beim Nachweis eines Amplifikats konnten Inhibitoren ausgeschlossen werden.

2.3.6 Nachweis der DNA-Extraktion

Bei fehlendem Amplifikat nach der Zygomyceten- und Aspergillus nested-PCR wurde eine Überprüfung der DNA-Extraktion erforderlich. Dazu wurde eine nested-GAPDH-PCR mit Zielsequenz im humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen oder eine β -Globin-PCR mit Zielsequenz im humanen β -Globin-Gen durchgeführt. Der Nachweis der Zielsequenz in mindestens einem der Gene bestätigt die erfolgreiche Extraktion humaner DNA. Dabei hat die GAPDH-PCR durch die nachfolgende nested-PCR eine höhere Sensitivität und wurde vor allem zur Bestätigung geringer Mengen humaner DNA verwendet, wie sie bei Schnitten von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben erwartet werden können.

Bei positivem Ergebnis der GAPDH oder β -Globin PCR wurde der DNA-Extrakt mit der Speedvac auf ca. 50 μ l eingengt um die DNA-Konzentration zu erhöhen. Die spezifischen PCRs wurden wiederholt. Bei negativer GAPDH- bzw. β -Globin-PCR wurde die Extraktion bei vorhandenem Material wiederholt.

β -Globin PCR

Es wurden die Primer G1: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3' und G2: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' verwendet. Sie sind zu den Positionen 70400 – 70419 bzw. 70667 – 70648 des auf dem Chromosom 11 des Homo sapiens liegenden β -Globin-Gens komplementär (GenBank accession number NG'_000007.3). Das entstehende Fragment ist 268 bp lang. Der Reaktionsansatz bestand aus 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3mM $MgCl_2$ (10 x Perkin Elmer Puffer II plus $MgCl_2$ -Lsg.), 2 μ M von jedem Primer G 1 / 2, 1,5 U AmpliTaq DNA Polymerase, 100 μ M von jedem Desoxynukleosidtriphosphat, sowie 5 μ l Proben-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 μ l. Das Temperaturprofil entsprach dem der Zygomyceten- und Aspergillus-PCR, außer dass die DNA-Synthese Zeit auf 45 Sekunden verkürzt war (siehe Tabelle 6). Auch bei der β -Globin-PCR wurden Leerwerte, Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Für die Positivkontrolle wurde humane Leukozyten-DNA, für die Negativkontrolle kommerzielle Fisch-DNA benutzt.

Tabelle 5: Reaktionsansatz der β -Globin PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H ₂ O _{Amp}	31,2 μ l	
10 x Puffer	5 μ l	10 mM Tris-HCl ; 50 mM KCl
MgCl ₂ -Lsg.	6 μ l	3 mM MgCl ₂
Primer G 1	1 μ l	2 μ M
Primer G 2	1 μ l	2 μ M
dNTP-Mix	0,5 μ l	100 μ M dNTP
AmpliTaq	0,3 μ l	1,5 U
DNA-Extrakt	5 μ l	
Gesamtvolumen	50 μ l	

Tabelle 6: Temperaturprofil der β -Globin- und GAPDH-PCR

DNA-Denaturierung	94°C für 5 min	
Denaturierung	94°C für 30 sek	} 35 Zyklen
Annealing β -Globin- (GAPDH-PCR)	50°C (56°C) für 30 sek	
DNA-Synthese	72°C für 45 sek	
Elongation	72°C für 5 min	

GAPDH-PCR

Die verwendeten Primer GAP 1: 5'-GAC AAC AGC CTC AAG ATC ATC-3' und GAP 2: 5'-GAC GGC AGG TCA GGT CCA CCA-3' [5] sind komplementär zu den Positionen 3816 – 3836 und 4425 – 4405 des humanen GAPDH-Gens (GenBank accession number J04038.1) Sie amplifizieren ein 609 bp langes Fragment. Im Reaktionsansatz waren 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂ (10 x Perkin Elmer Puffer II plus MgCl₂-Lsg.), 1 μ M von jedem Primer Gap 1/ Gap 2, 1,5 U AmpliTaq DNA-Polymerase, 200 μ M von jedem Desoxynukleosidtriphosphat sowie 10 μ l DNA-Extrakt in einem Gesamtvolumen von 50 μ l enthalten. Das Temperaturprofil entsprach dem der β -Globin PCR,

außer dass die Annealing-Temperatur 56°C (Tabelle 6) betrug. Als Kontrollen wurden wie bei der β -Globin PCR Fisch-DNA und humane DNA verwendet.

Tabelle 7: Reaktionsansatz der GAPDH- und GAPDH nested-PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u> <u>(nested)</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H ₂ O _{Amp}	27,7 μ l (35,7)	
10 x Puffer	5 μ l	10 mM Tris-HCl ; 50 mM KCl
MgCl ₂ -Lsg.	5 μ l	2,5 mM MgCl ₂
Primer Gap 1 /Gap 3	0,5 μ l	1 μ M
Primer Gap 2 / Gap 4	0,5 μ l	1 μ M
dNTP-Mix	1 μ l	200 μ M dNTP
AmpliTaq	0,3 μ l	1,5 U
DNA-Extrakt/Produkt 1. PCR	10 μ l/ 2 μ l	
Gesamtvolumen	50 μ l	

GAPDH nested-PCR

Die Primer der nested-Reaktion GAP 3: 5'-AAT GCC TCC TGC ACC ACC-3' und GAP 4: 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG-3' sind zu den Positionen 3932 – 3949 sowie 4372 – 4355 des humanen GAPDH-Gens komplementär und amplifizieren ein 325 bp langes Fragment. Im Reaktionsansatz der nested-PCR waren 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂ (10 x Perkin Elmer Puffer II plus MgCl₂-Lsg.), 1 μ M von jedem Primer GAP 3 / 4, 1,5 U AmpliTaq DNA Polymerase, 200 μ M von jedem Desoxynukleosidtriphosphat sowie 2 μ l der ersten PCR in einem Gesamtvolumen von 50 μ l enthalten. Das Temperaturprofil entsprach dem der ersten PCR (Tabelle 6).

Tabelle 8: Primer der PCRs zum Nachweis humaner DNA

Primer	Sequenz (5'-3' Richtung)	GenBank(a.n.)*	Position
G 1	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	NG'_000007.3	70400 - 70419
G 2	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	NG'_000007.3	70667 - 70648
GAP 1	GAC AAC AGC CTC AAG ATC	J04038.1	3816 - 3836
GAP 2	GAC GGC AGG TCA GGT CCA CCA	J04038.1	4425 - 4405
GAP 3	AAT GCC TCC TGC ACC ACC	J04038.1	3932 - 3949
GAP 4	ATG CCA GTG AGC TTC CCG	J04038.1	4372 - 4355

*GenBank accession number

2.3.7 Aufreinigung und Sequenzierung der Amplifikate

Die Produkte der nested-PCR wurden mittels QIAquick® PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zum nested-PCR Produkt wurde das fünffache Volumen PB-Puffer gegeben und nach kurzem Mischen auf die QIAquick®-Säulen mit Auffangbehälter aufgetragen. Um die DNA an die Säulenmembran zu binden wurde bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Nach dem Ausleeren des Auffanggefäßes wurden 0,75 ml PE-Puffer zum Waschen zugegeben und bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde nach Entleeren des Filtrats wiederholt. Die Säulen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben. Zum Eluieren der DNA wurden 30 µl EB-Puffer auf die Säulenmembran gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min befand sich die gereinigte DNA im Eluat.

DNA-Konzentrationsmessung

Die DNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch bestimmt. Es wurde eine Einmal-Plastik-Küvette mit 60 µl EB-Puffer aus dem QIAquick® PCR Purification Kit befüllt, um damit das Spektralphotometer auf den Nullwert einzustellen. Zu der Lösung wurden dann 5 µl Proben-DNA hinzu gegeben. Der gemessene Wert wurde in der Einheit µg/ml vom Gerät angezeigt.

PCR zur Sequenzierung der Produkte

Die Cycle-Sequenzreaktion (Cycle Sequencing) wurde mit dem ABI PRISM[®] Big Dye[®] Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Bei dieser Methode handelte es sich um die weiterentwickelte Form der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. [77].

In der Markierungs-PCR werden die Amplifikate durch die im Kit enthaltenen fluoreszenzmarkierten 2',3'Dideoxynukleosid-5'Triphosphate (vom Hersteller als Dye Terminatoren bezeichnet) markiert. Wie bei der klassischen Sanger-Coulson-Methode führt der zufällige Einbau dieser fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotide in der Elongationsphase zum Kettenabbruch.

Für die Markierungs-PCR wurden in jedes Reaktionsgefäß 4-8µl (angestrebte Konzentration ca. 90 ng) des nested-PCR-Produkts, 3 µl Primer (2 pmol/µl) und 4 µl Big Dye gegeben und mit LiChrosolv[®] (steriles Wasser) auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Als Sequenzier-Primer wurden AM 3 und ZM 3 verwendet. Für die Sequenzanalyse der Pilzspezies wurde auch der Vorwärtsprimer AM 1 verwendet, um die Basenabfolge des gesamten Amplifikats zu bestimmen.

Tabelle 9: Reaktionsansatz der Cycle Sequencing-PCR

Reagenz	Volumen in µl
Big Dye	4
Primer	3
DNA	3 – 12
LiChrosolv [®]	ad 20

Tabelle 10: Temperaturprofil der Cycle Sequencing-PCR

Denaturierung	96°C	30 sek	} 25 Zyklen
Annealing	50°C	15 sek	
Elongation	60°C	4 min	

Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Centri Sep[®]-Säulen

Zur anschließenden Eliminierung von überschüssigen Dye-Terminatoren wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe von Centri-Sep[®]-Zentrifugationssäulen gereinigt. Zur Vorbereitung der Säulen wurde jede Säule mit 800 µl LiChrosolv[®] beladen und kurz gevortext. Zur Bildung des Gels wurden die Säulen mindestens 30 Minuten stehen gelassen. Nun wurde zuerst die obere, dann die untere Verschlusskappe entfernt und die Säulen einige Minuten in Sammelgefäßen stehen gelassen. Es sollten ca. 250 µl LiChrosolv[®] herauslaufen, ansonsten wurde mit einem Gummisauger nachgeholfen. Die Säulen wurden 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die gesamten 20 µl des PCR-Produktes vom Cycle Sequencing wurden auf die Mitte der Säule aufgetragen. Nun wurde die Säule in ein Eppendorfgefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Das die Probe enthaltende Eluat wurde bis zum Auftragen auf das Sequenziergel bei -20°C gelagert.

Sequenzanalyse

Für den Sequenzierungslauf wurden 4 µl der Probe mit 16 µl Formamid versetzt. Mit der Data Collecting Software 3100 (Applied Biosystems, Darmstadt) wurden die Daten ausgewertet.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden unter der Verwendung des Suchprogrammes BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; www.ncbi.nlm.nih.gov) mit den Daten der NCBI-GenBank (National Center of Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) verglichen. Im Falle eines Nachweises von *Aspergillus fumigatus* wurde das Ergebnis der PCR nur bei einer 100%igen Übereinstimmung der DNA-Sequenz mit der Sequenz der Datenbank als positiv gewertet. Beim Nachweis von *A. terreus*, *A. flavus* oder *A. niger* wurde eine 100% Übereinkunft der Basenabfolge mit der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sequenzen gefordert. Andernfalls wurde das PCR-Produkt als eine unspezifische Amplifikation angesehen.

Mittels Zygomyceten-PCR konnte neben Zygomyceten-spezifischer DNA auch DNA von Pilzen gefunden werden, die zum Stamm der *Basidiomycota* gehören.

Die Sequenzen zeigten eine 97-100%ige Homologie mit Sequenzen diverser *Basidiomycota*, so dass eine Identifizierung von nur einer Spezies nicht möglich war.

Für nachfolgende Ergebnisse gilt, dass alle Amplifikate, die im Agarosegel Hinweis auf eine der gesuchten Pilzspezies ergaben, sequenziert wurden. Nur durch die Sequenzierung kann geklärt werden, ob es sich um ein spezifisches nested Produkt handelt; da auch unspezifische Amplifikate und Amplifikate der DNA anderer Pilze eine ähnliche Basenlänge aufweisen können.

3. Ergebnisse

3.1 Paraffin-eingebettete Gewebeproben

3.1.1 Aspergillus-PCR

Von 81 untersuchten Proben wiesen 58 ein Amplifikat auf, das sequenziert wurde. Davon wurden 47 als *Aspergillus fumigatus*-spezifische und ein Amplifikat als *Aspergillus flavus*-spezifische DNA identifiziert (62%). In den übrigen 10 Proben ergab die Sequenzierung kein weiter identifizierbares Amplifikat, so dass von einer unspezifischen Amplifikation ausgegangen wurde. In 23 Proben (28%) konnte keine *Aspergillus*-spezifische DNA nachgewiesen werden.

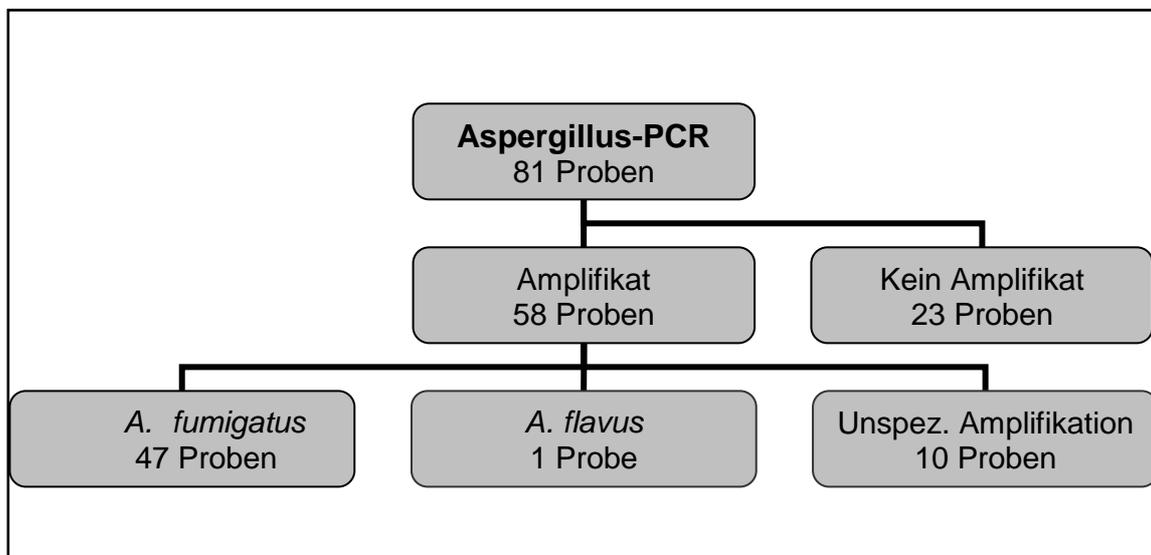


Abbildung 4: Ergebnisse der Aspergillus-PCR

3.1.2 Zygomyceten-PCR

Bei 45 Proben wurde ein Amplifikat erwarteter Länge (177 bp) im Agarosegel nachgewiesen. Die Sequenzierung ergab jedoch nur in einem einzigen Fall eine 100%ige Übereinstimmung mit der 18S-DNA Teilsequenz eines Zygomyceten, nämlich *Rhizomucor pusillus*. In einer Probe konnte eine Genteilsequenz gefunden werden, die zu 100% der des Hautkeims *Trichosporum cutaneum* homolog war. In 31 Proben (38%) fanden sich Sequenzen, die keine Homologie zu Pilzen aus dem Stamm der *Zygomycota* aufwiesen. Stattdessen ließ sich in

diesen Fällen eine 97-99%ige Homologie zu diversen *Basidiomycota* finden. In 36 Proben (44%) konnte mit der Zygomyceten PCR keine DNA amplifiziert werden.

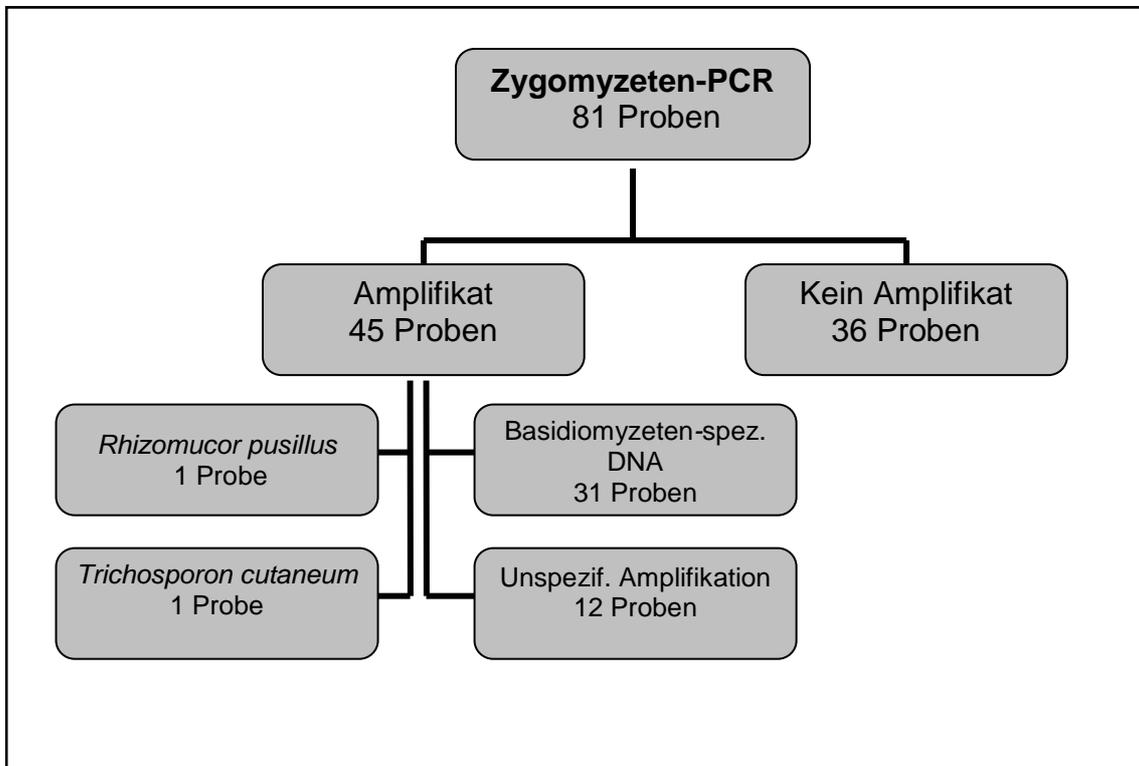


Abbildung 5: Ergebnisse der Zygomyceten-PCR

3.1.3 Aspergillus- und Zygomyceten-PCR

Von den 48 Proben mit Nachweis spezifischer *Aspergillus*-DNA wiesen 18 in der Zygomyceten-PCR ein Amplifikat auf, das als Basidiomyceten-spezifische DNA identifiziert wurde. In einer Probe wurde neben spezifischer DNA von *A. fumigatus* auch DNA von *Rhizomucor pusillus* nachgewiesen. Aus 29 Proben konnte mit der Zygomyceten-PCR keine DNA amplifiziert werden.

Aus 19 der 33 *Aspergillus*-PCR negativen Proben konnte auch mit der Zygomyceten-PCR keine DNA amplifiziert werden. In 13 Proben wurde Basidiomyceten-spezifische DNA nachgewiesen (17%). Aus einer Probe konnte DNA amplifiziert werden, deren Sequenz zu 100% mit der von *Trichosporum cutaneum* identisch war.

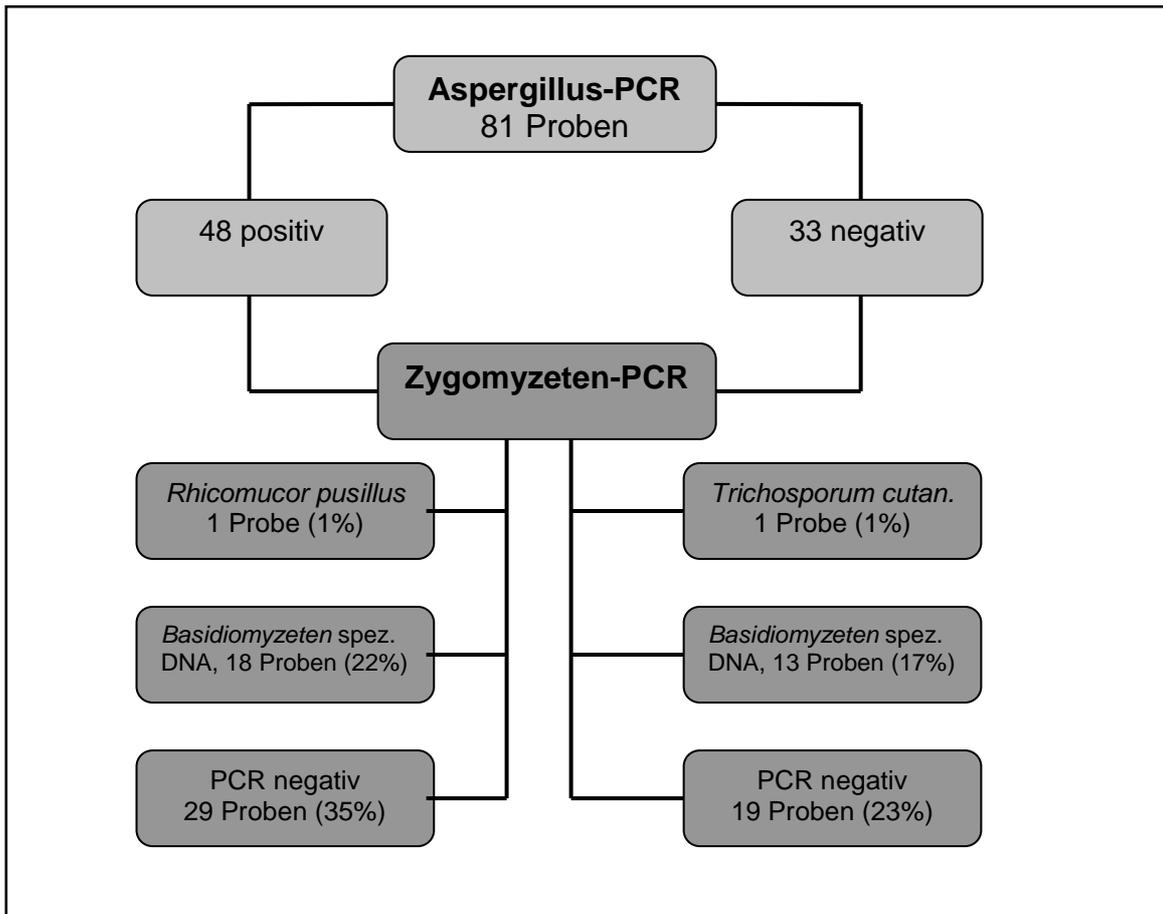


Abbildung 6: Übersicht aller Ergebnisse der Aspergillus- und Zygomyceten-PCRs

3.1.4 β -Globin- und GAPDH-PCR

Bei 15 von 81 Proben wurde zunächst eine β -Globin-PCR durchgeführt, die in keinem Fall zur Amplifikation von humaner DNA führte. In 38 von 40 Proben konnte mittels nested GAPDH-PCR humane DNA nachgewiesen werden, unter anderem auch in den 15 β -Globin-PCR negativen Proben. In den übrigen zwei Proben konnte nicht nur in der nested GAPDH-PCR kein entsprechendes Amplifikat nachgewiesen werden, auch die Aspergillus-PCR blieb negativ. Bei der Wiederholung der nested GAPDH-PCR konnte ebenfalls keine spezifische DNA gefunden werden. Inhibitoren konnten ausgeschlossen werden. Beide Proben wurden ein zweites Mal extrahiert und die nested GAPDH-PCR wiederholt. Diese fiel abermals negativ aus, so dass davon ausgegangen

werden musste, dass aus diesen zwei Gewebeblöcken keine amplifizierbare humane DNA mehr zu extrahieren war.

3.1.5 Vergleich mit den früheren PCR-Ergebnissen aus Wien

Für die in Wien durchgeführte PCR wurden Universalprimer für die Zielsequenz in der 28S rDNA nach Sandhu et al. verwendet [76]. Diese amplifizieren ein 260 bp langes Fragment. Die Sequenzierung erfolgt ohne vorherige Klonierung der Amplifikate. Homologien von mindestens 98% zu wenigstens 75% der Länge des Amplifikats wurden als signifikant betrachtet [105].

In 47 Gewebeproben konnte *A. fumigatus* nachweisen werden; dieses Resultat war in 26 Fällen deckungsgleich mit den Ergebnissen aus Wien. In zwei der verbleibenden 21 Proben, in denen *A. fumigatus* nachweisen werden konnte, zeigte sich in Wien hingegen ein negatives Ergebnis. In den restlichen 19 der 47 *Aspergillus fumigatus* positiven Proben konnte in Wien keine *Aspergillus*-spezifische DNA amplifiziert werden. Mit der dort verwendeten PCR wurden verschiedene andere Pilze nachgewiesen. In 11 Fällen konnte das Amplifikat nicht eindeutig sequenziert werden. Eine exakte Auflistung findet sich in nachstehender Tabelle 11. In einer Gewebeprobe konnte mit der hier verwendeten *Aspergillus*-PCR *A. flavus*-spezifische DNA nachweisen werden, wohingegen die in Wien durchgeführte PCR zwar DNA amplifizierte, deren Sequenz aber nicht zu einer Identifizierung führte.

Tabelle 11: Vergleich der Aspergillus-PCR positiven Proben mit den früheren PCR-Ergebnissen aus Wien

Anzahl	Aspergillus-PCR	n	Wien
26	<i>A.fumigatus</i>	26	<i>A.fumigatus</i>
2	<i>A.fumigatus</i>	2	negativ
19	<i>A.fumigatus</i>	11	nicht identifizierbar
		5	<i>Basidiomycota: Itersonilia perplexans, Strobilurus trullisatus, Malassezia globosa</i>
		3	<i>Ascomycota: Blumeria graminis, Candida pseudointermedia, Candida tropicalis</i>
1	<i>A. flavus</i>	1	nicht identifizierbar

Wie in Tabelle 12 dargestellt ist konnte in 33 Proben keine *Aspergillus*-spezifische DNA detektiert werden. Dieses Ergebnis deckt sich wiederum in 15 Fällen mit denen aus Wien. In den übrigen 18 Proben wurde mit der PCR in Wien in einem Fall *Aspergillus fumigatus* und in weiteren 13 erneut verschiedene Pilze, darunter in zwei Fällen *Aspergillus versicolor*, nachgewiesen.

Tabelle 12: Vergleich der Aspergillus-PCR negativen Proben mit den Ergebnissen der zuvor durchgeführten Untersuchungen in Wien

Anzahl	Aspergillus-PCR	n	Wien
15	negativ	15	negativ
18	negativ	8	<i>Ascomycota: Saccharomyces cerevisiae, Blumeria graminis, Penicillium expansum, Phialemonium dimorphosporum</i>
		4	nicht identifizierbar
		3	<i>Basidiomycota: Malassezia restricta, Itersonilia perplexans</i>
		2	<i>Aspergillus versicolor</i>
		1	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Die Ergebnisse der Aspergillus-PCR lassen sich vergleichend in einer Vier-Felder-Tafel darstellen. Hierzu wurden alle Proben als positiv gewertet, die *Aspergillus*-spezifische DNA enthielten (Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich *Aspergillus* positiver Proben

Tübingen Wien	positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	26	3 (2x <i>A. versicolor</i>)	29
Negativ	22 (1x <i>A. flavus</i>)	30	52
Gesamt	48	33	81

In 45 Proben konnte mittels Zygomyceten-PCR ein Amplifikat gefunden werden. 12 dieser Amplifikate erwiesen sich in der Sequenzierung als unspezifisch. In einer Probe konnte DNA von *Rhizomucor pusillus* nachgewiesen werden. Wie aus Tabelle 14 ersichtlich ist, wurde mit der PCR in Wien *A. fumigatus*-spezifische DNA in dieser Probe nachgewiesen. In der Probe mit Nachweis von *Trichosporum cutaneum*-DNA wurde zuvor DNA von *Saccharomyces cerevisiae* gefunden. Schließlich konnte mittels Zygomyceten-PCR in 31 Fällen DNA von Basidiomyceten nachgewiesen werden. In 8 dieser 31 Proben war in Wien keine Identifizierung möglich; in zwei Fällen blieb die PCR negativ. In 10 der 33 Gewebeproben amplifizierte die Wiener PCR *Aspergillus fumigatus*, in einem Fall *Aspergillus versicolor*. In sechs Proben konnten in Wien DNA von anderen *Ascomycota* nachgewiesen werden. In vier Proben wurde übereinstimmend DNA von *Basidiomycota* gefunden.

Tabelle 14: Vergleich von Proben, in denen die Zygomyceten-PCR positiv war mit Ergebnissen aus Wien

n	Zygomyceten-PCR	n	Wien
1	<i>Rhizomucor pusillus</i>	1	<i>A. fumigatus</i>
1	<i>Trichosporon cutaneum</i>	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
31	<i>Basidiomycota</i>	8	nicht identifiziert
		10	<i>A. fumigatus</i>
		1	<i>A. versicolor</i>
		2	negativ
		6	<i>Ascomycota</i> : 2 <i>Blumeria graminis</i> , 4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		4	<i>Basidiomycota</i> : 1 <i>Itersonilia perplexans</i> , 1 <i>Strobilurus trullisatus</i> , 2 <i>Malassezia restricta</i> u. <i>globosa</i>

In 48 Proben konnte mittels Zygomyceten-PCR keine spezifische DNA amplifiziert werden. Ein Vergleich dieser Proben mit denen aus Wien findet sich in nachstehender Tabelle 15. In 15 Proben konnte auch in Wien keine DNA nachgewiesen werden. In 16 der Zygomyceten negativen Proben wurde DNA von *A. fumigatus*, in einer DNA von *A. versicolor* und in vier DNA von Pilzen der Gruppe der *Basidiomycota* sowie in vier weiteren DNA von Pilzen des Stammes *Ascomycota* nachgewiesen. In acht Proben wurde DNA amplifiziert, die jedoch nicht identifizierbar war.

Tabelle 15: Vergleich der Zygomyceten-PCR negativen Proben mit Ergebnissen der früher in Wien durchgeführten PCR

Anzahl	Zygomyceten-PCR	n	Wien
15	negativ	15	negativ
33	negativ	16	<i>A. fumigatus</i>
		8	nicht identifizierbar
		4	<i>Basidiomycota</i>
		4	<i>Ascomycota</i>
			<i>A. versicolor</i>

Eine Zusammenstellung aller Ergebnisse findet sich in Tabelle 19 im Anhang.

3.2 Aspergillus-PCR mit verschiedenen Pilzspezies

3.2.1 Sequenzen der Aspergillus-PCR Amplifikate verschiedener *Aspergillus*-Spezies

In Abbildung 7 sind die ermittelten Sequenzen des nested PCR-Produkts von *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* und *A. flavus* vergleichend dargestellt.

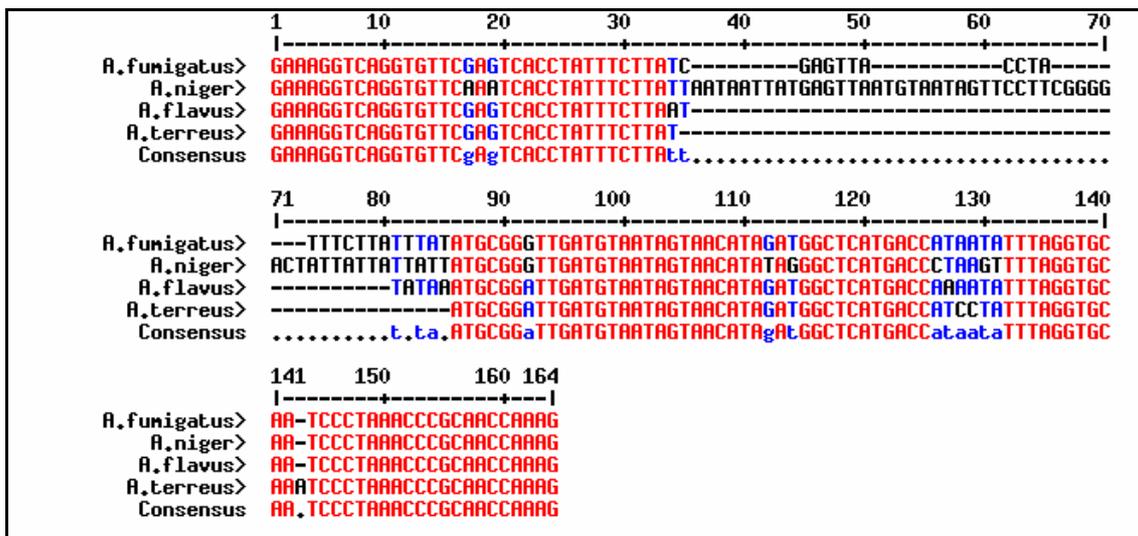


Abbildung 7: Abbildung des nested PCR-Produkts verschiedener *Aspergillus*-Spezies nach Corpet [20]

Die Nukleotide Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin wurden mit den jeweiligen Anfangsbuchstaben abgekürzt. Die roten Buchstaben stehen für Übereinstimmungen der Basenpaare der verschiedenen Spezies untereinander. Blaue und schwarze Buchstaben kennzeichnen nicht übereinstimmende Nukleotide. Das PCR-Produkt der DNA von *A. fumigatus* besteht aus 135 bp. Das PCR-Produkt der DNA von *A. niger* hingegen besteht aus 163 bp, das von *A. flavus* aus 118 bp und das von *A. terreus* aus 113 bp. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, stimmen die ersten 33 Basen bei *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. terreus* komplett überein. *A. niger* hingegen unterscheidet sich in Position 17 und 19 von den übrigen Stämmen, da an diesen Stellen jeweils Guanin durch Adenin ersetzt ist. Die folgenden 17 Basen stellen eine Art Insert bei *A. fumigatus* dar. Es handelt sich dabei um eine charakteristische Abfolge von Basen, die *A. fumigatus* als einzige aller *Aspergillus*-Spezies, deren DNA

amplifiziert wurde, aufweist. Auch *A. niger* hat ein Insert, das sich von den anderen Stämmen unterscheidet. Dieses umfasst 51 Nukleotide, so dass *A. niger* mit insgesamt 163 bp das längste PCR-Produkt aufweist. Dadurch kann das Produkt von *A. niger* im Agarosegel von *A. terreus*-, *A. fumigatus*- und *A. flavus*-Produkten unterschieden werden (Abb. 7). Ab Position 86 weist die Basenabfolge bei allen vier *Aspergillus*-Stämmen wieder große Homologien auf. Es zeigen sich nur noch vereinzelt Differenzen. Anhand der Sequenzierung lassen sich die Produkte dieser vier verschiedenen *Aspergillus*-Arten unterscheiden.

In Abbildung 8 sind PCR-Produkte nach Einsatz der DNA von *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *A. terreus* und *A. flavus* im Ethidiumbromid-gefärbtem Agarosegel unter UV-Licht dargestellt.

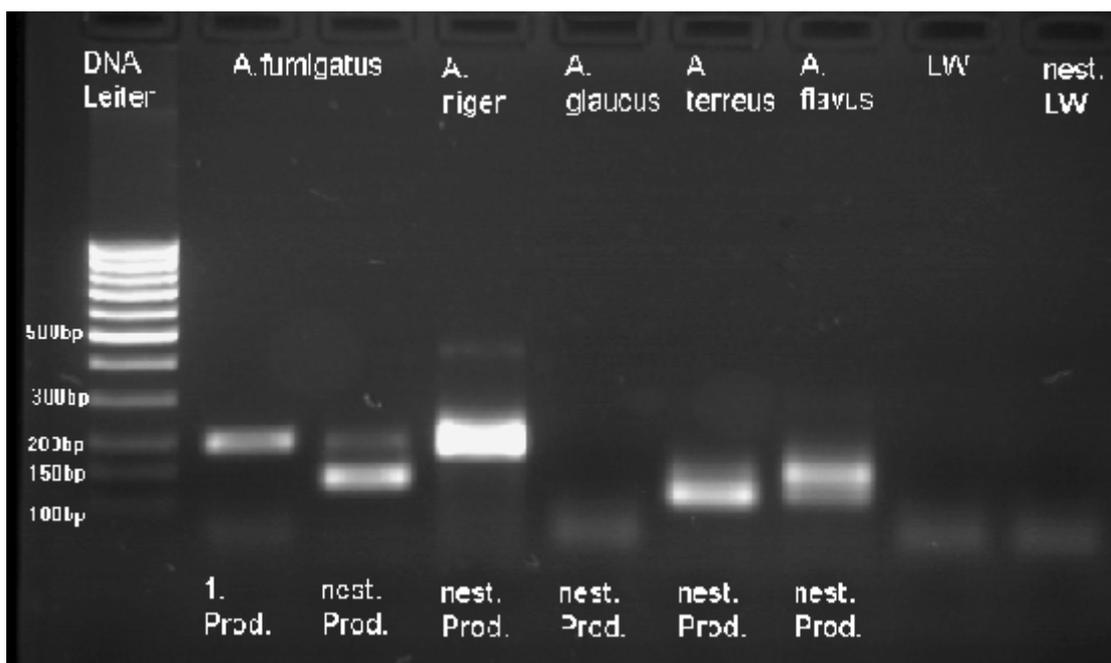


Abbildung 8: Ergebnis der Amplifikation von DNA verschiedener *Aspergillus*-Stämme nach Agarosegel-Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid. LW=Leerwert, nest. LW= Leerwert der nested PCR

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, weist das Produkt der ersten PCR mit DNA von *A. fumigatus* eine Länge von 201 bp auf. Das Produkt der nested PCR mit einer Länge von 135 bp bildet sich deutlich darunter ab, wenngleich das

Produkt der ersten PCR noch als schwache Bande zu erkennen ist. Das nested Produkt eines *A. niger* Stammes mit einer erwarteten Länge von 163 bp liegt über dem nested Produkt von *A. fumigatus*. Durch Überlagerung mit dem Produkt der ersten PCR kommt eine kräftige breite Bande zur Darstellung. Bei Verwendung von DNA von *A. glaucus* kommt es nicht zur Amplifikation; in der entsprechenden Spur ist ausschließlich die „Primerwolke“ erkennbar. Übereinstimmend mit den Daten des Blindversuchs (siehe 3.3) zeigt sich, dass DNA von *A. glaucus* mit dieser PCR nicht amplifiziert werden kann. Die nested PCR-Produkte von *A. terreus* (113 bp) und *A. flavus* (118 bp) weisen im Gel unterschiedliche Basenpaarlängen auf, so dass sie unterschieden werden können.

3.2.2 Spezifität der PCR-Verfahren

Mit der Aspergillus-PCR wurde auch DNA von *Coccidioides posadasii* und *Histoplasma capsulatum* amplifiziert, so dass neben *Aspergillus*-spezifischer DNA auch DNA anderer Pilzstämme amplifiziert werden kann. Testungen mit DNA von *C. dubliensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* und *C. glabrata* ergaben jedoch negative PCR-Ergebnisse. Durch die Aspergillus-PCR kann weder DNA von Zygomyceten noch von Basidiomyceten vervielfältigt werden. DNA von *Aspergillus*-Stämmen wird durch die Zygomyceten-PCR nicht amplifiziert.

3.3 Identifizierung verblindeter *Aspergillus*-Stämme

In fünf von 17 Pilz-Suspensionen wurde spezifische DNA von *A. fumigatus* nachgewiesen. Spezifische DNA von *A. flavus* wurde in vier, die von *A. niger* in zwei und DNA von *A. terreus* in drei Suspensionen amplifiziert. In einem Fall war das Amplifikat nicht sequenzier- und identifizierbar. Nach der Ermittlung der Ergebnisse wurden die Daten entblindet und ausgewertet. Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurde neben den vier *A. fumigatus* enthaltenden Suspensionen in einer weiteren DNA von *A. fumigatus* amplifiziert. Übereinstimmend mit der gelösten Pilzspezies wurde in vier Suspensionen *A. flavus*- und in drei *A. terreus*-spezifische DNA nachgewiesen. Von den vier DNA von *A. niger*

enthaltenden Suspensionen wurden nur zwei als solche identifiziert. DNA von *A. glaucus* konnte in keiner der beiden Suspensionen nachgewiesen werden.

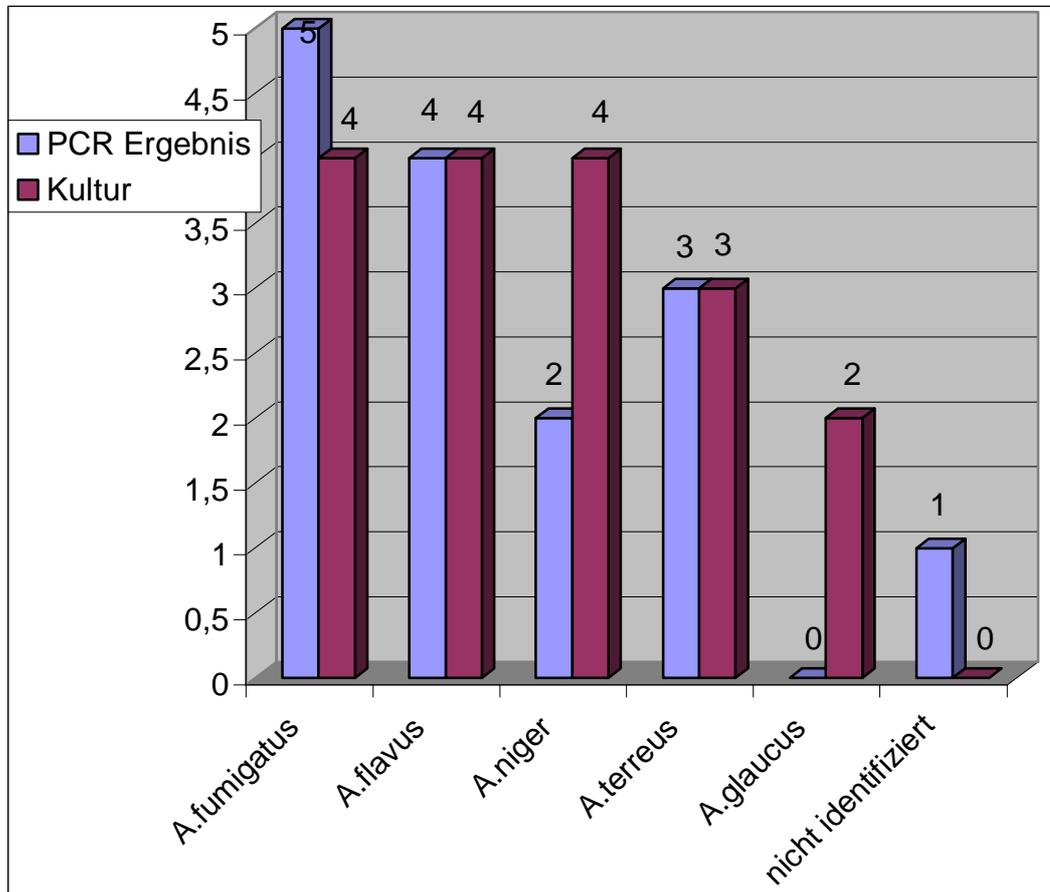


Abbildung 9: Ergebnisse der Identifizierung verblindeter Aspergillus-Stämme mittels PCR

A. niger-spezifische DNA konnte nur in der Hälfte der vorgegebenen Suspensionen nachgewiesen werden. In einer der zwei Proben war im Gel ein Amplifikat nicht sicher erkennbar. Die zur Identifizierung durchgeführte Sequenzierung ergab in einem Fall keine eindeutig lesbare Sequenz und im anderen fand sich DNA von *A. fumigatus*. Eine Kontamination bei der Extraktion kann in Anbetracht der hohen Konzentrationen an Pilz-DNA nicht ausgeschlossen werden. Ebenso ist eine Kontamination bei der Herstellung der Pilzsuspensionen denkbar. DNA von *A. glaucus* konnte mit der PCR nicht amplifiziert werden.

Tabelle 16: Einzelergebnisse der Identifizierung von Aspergillus-Stämmen mittels Aspergillus-PCR

Nr.	Sequenzierungsergebnis TÜ	Kultur (Wien)
1	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> (Laborprobe)
2	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
3	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
4	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>
5	Kein Amplifikat	<i>A. glaucus</i>
6	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>
7	Sequenz nicht identifizierbar	<i>A. niger</i>
8	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
9	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> (LP)
10	Kein Amplifikat	<i>A. glaucus</i> (LP)
11	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>
12	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>
13	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i> (LP)
14	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
15	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> (ATCC 204305)
16	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i> (ATCC 204304)
17	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i> (LP 1949)

Nach Auswertung der Ergebnisse des Blindversuchs wurde anhand neuerlich zugesandter *A. niger*- und *A. glaucus*- Suspensionen nochmals versucht, entsprechend spezifische DNA nachzuweisen. Aus je zwei *A. glaucus*- und *A. niger*- Suspensionen wurden pro Stamm insgesamt acht Extraktionen vorgenommen. Während die *A. niger* Proben als solche identifiziert werden konnten gelang die Amplifikation von *A. glaucus* DNA in keinem der Fälle.

Zusammenfassend ergab dieser Versuch, dass die DNA von *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* und *A. flavus* mit der Aspergillus-PCR amplifiziert und mittels Sequenzierung identifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu wird DNA von *A. glaucus*- Stämmen nicht amplifiziert.

3.4 Aspergillus-Ringversuch

In 22 der 50 Proben wurde DNA amplifiziert. Die Sequenzierung der Amplifikate ergab in 10 Proben *A. fumigatus*- in vier *A. terreus*- und in acht *A. flavus*-spezifische DNA. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Aspergillus-PCR und der Sequenzierungen mit den Vorgaben des Ringversuchs dargestellt.

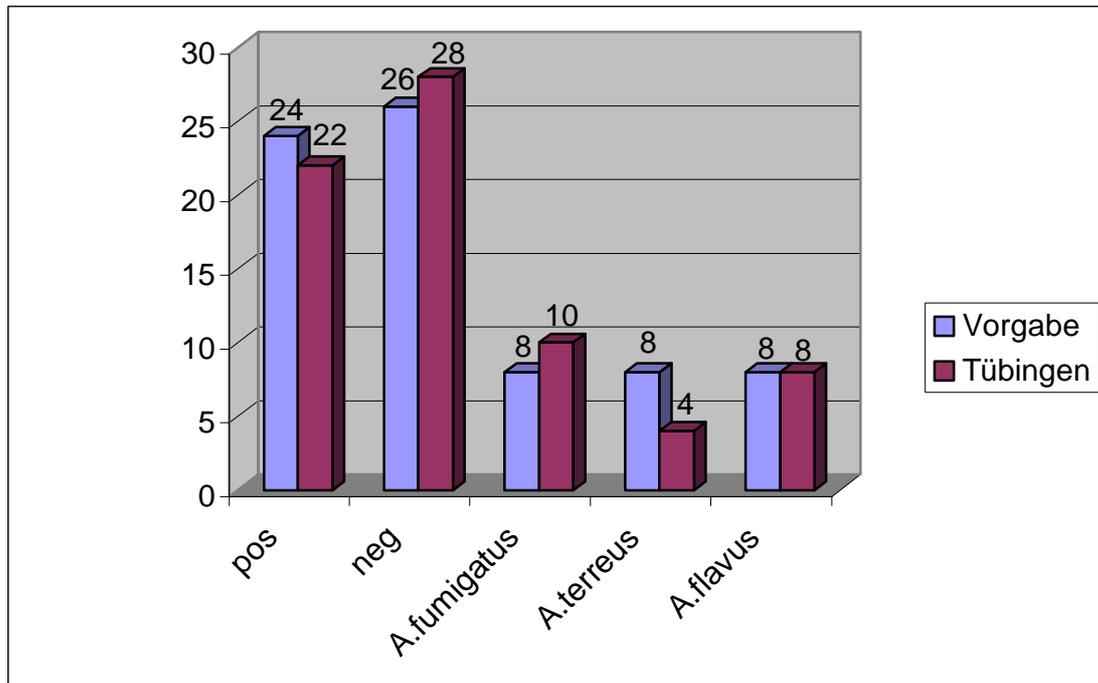


Abbildung 10: Ergebnisse der Aspergillus-PCR verblindeter Proben des Ringversuchs

In acht Proben waren unterschiedliche DNA-Konzentrationen von *A. fumigatus* enthalten. Dabei enthielten drei Proben DNA von 10 CFU, weitere drei jeweils von 1000 CFU und zwei Proben DNA von 10000 CFU. Unabhängig von der Konzentration wurde in allen Fällen (100%) *A. fumigatus*-spezifische DNA nachgewiesen. Zudem fand sich in zwei weiteren Proben DNA von *A. fumigatus*. Allerdings waren die dazugehörigen Banden im Agarosegel im Verhältnis zu den übrigen *A. fumigatus* enthaltenden Proben schwach, so dass für diese falsch positiven Befunde am ehesten Kontaminationen ursächlich sind.

Drei Proben enthielten DNA von 10 CFU von *A. flavus*; zwei weitere DNA von 1000 CFU und weitere drei von 10000 CFU *A. flavus*. Aus allen Proben wurde

DNA amplifiziert, die mittels Sequenzierung als *A. flavus*-spezifisch identifiziert wurde (100%).

In acht Proben war DNA von *A. terreus* enthalten. Nur die Hälfte der DNA von *A. terreus* enthaltenden Extrakte ergab eine positive PCR bzw. ein Amplifikat, das sequenziert wurde. Die in den Proben 6, 13, 17 und 44 enthaltene *A. terreus*-spezifische DNA konnte problemlos nachgewiesen werden. Die Proben 6 und 7 enthielten mit 100 CFU die geringste DNA-Konzentration während die Proben 13 und 44 je 10000 CFU beinhalten. Abbildung 11 zeigt beispielhaft u.a. das Amplifikat der Probe Nr.6. Die Bande des nested Produkts von *A. terreus* DNA bildet sich erwartungsgemäß unterhalb der charakteristischen Vergleichsbande der *A. fumigatus*-Positivkontrolle und der Spuren 1, 3 und 8 ab, die *A. fumigatus* spezifische DNA enthalten.

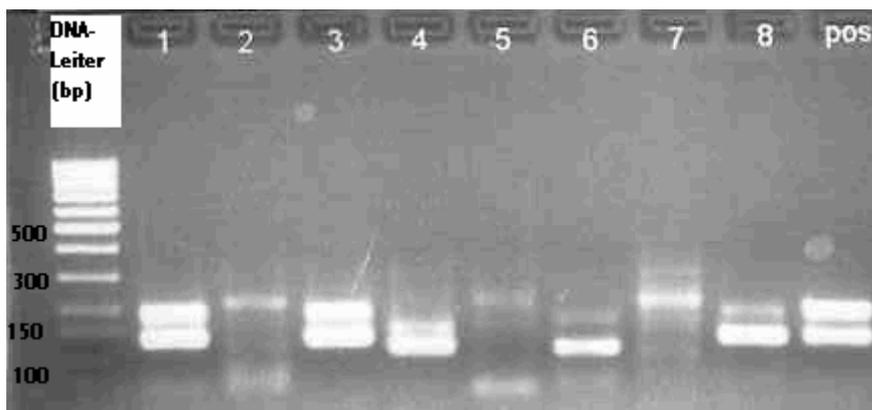


Abbildung 11: Darstellung von PCR-Produkten des Ringversuchs im Ethidiumbromid-gefärbtem Agarosegel. 6 = *A. terreus*; 1, 3 u. 8 = *A. fumigatus*; 4 = *A. flavus* ; pos.=Positivkontrolle

Probe Nr. 24 enthielt zwar DNA von 10000 CFU *A. terreus*, jedoch war im Gelbild lediglich eine extrem schwache Bande sichtbar. Dies führte dazu, dass die Probe als negativ bewertet und deshalb nicht sequenziert wurde. Die Proben 15, 31 und 35 enthielten DNA von 1000 CFU *A. terreus*. Alle drei Amplifikate wurden sequenziert, allerdings zeigten sich Überlagerungen verschiedener Sequenzen, so dass *A. terreus*-spezifische DNA nicht eindeutig identifiziert werden konnte. In Tabelle 17 sind Einzelergebnisse des Ringversuchs dargestellt.

Tabelle 17: Vergleich der Ergebnisse des Ringversuchs nach Entblindung durch die Studienleitung

Nr.	Spezies und DNA-Konzentration von n [CFU]	Tübingen
1	<i>A. fumigatus</i> [10000]	<i>A. fumigatus</i>
2	negativ	negativ
3	<i>A. fumigatus</i> [1000]	<i>A. fumigatus</i>
4	<i>A. flavus</i> [10000]	<i>A. flavus</i>
5	negativ	negativ
6	<i>A. terreus</i> [100]	<i>A. terreus</i>
7	negativ	negativ
8	<i>A. fumigatus</i> [10]	<i>A. fumigatus</i>
9	<i>A. flavus</i> [1000]	<i>A. flavus</i>
10	negativ	negativ
11	negativ	negativ
12	<i>A. flavus</i> [1000]	<i>A. flavus</i>
13	<i>A. terreus</i> [10000]	<i>A. terreus</i>
14	negativ	negativ
15	<i>A. terreus</i> [1000]	negativ
16	negativ	negativ
17	<i>A. terreus</i> [100]	<i>A. terreus</i>
18	negativ	negativ
19	<i>A. flavus</i> [10]	<i>A. flavus</i>
20	negativ	negativ
21	negativ	negativ
22	negativ	negativ
23	<i>A. flavus</i> [10000]	<i>A. flavus</i>
24	<i>A. terreus</i> [10000]	negativ
25	<i>A. fumigatus</i> [1000]	<i>A. fumigatus</i>
26	negativ	negativ
27	negativ	<i>A. fumigatus</i> (schwache Bande)
28	negativ	negativ
29	<i>A. fumigatus</i> [10]	<i>A. fumigatus</i>
30	negativ	negativ
31	<i>A. terreus</i> [1000]	negativ
32	<i>A. fumigatus</i> [1000]	<i>A. fumigatus</i>
33	negativ	negativ
34	<i>A. flavus</i> [10000]	<i>A. flavus</i>
35	<i>A. terreus</i> [1000]	negativ
36	negativ	negativ
37	negativ	negativ
38	<i>A. flavus</i> [10]	<i>A. flavus</i>

39	negativ	negativ
40	negativ	negativ
41	negativ	negativ
42	A. fumigatus [10]	A. fumigatus
43	negativ	negativ
44	A. terreus [10000]	A. terreus
45	A. flavus [10]	A. flavus
46	negativ	negativ
47	negativ	negativ
48	A. fumigatus [10000]	A. fumigatus
49	negativ	negativ
50	negativ	A. fumigatus

4. Diskussion

4.1 Paraffin-eingebettete Gewebeproben / „fungus balls“

4.1.1 Aspergillus-PCR

Mittels Aspergillus-PCR konnte in 48 von 81 Proben mit histologischem Nachweis eines Pilzballes *Aspergillus*-spezifische DNA amplifiziert werden; in 47 Fällen (58%) war die amplifizierte DNA zu 100% mit der von *A. fumigatus* und in einer Probe mit der von *A. flavus* identisch. Somit stellt *Aspergillus fumigatus* in den untersuchten „fungus balls“ den durch die Aspergillus-PCR am häufigsten nachgewiesenen Pilz dar. Dies deckt sich mit den Angaben in der Literatur: Stammberger et al. wiesen *A. fumigatus* in einer Studie mit 140 Patienten mit massiver mykotischer Sinusitis als Haupterreger nach [86]. Buzina et al. sammelten über 28 Monate hinweg 233 Nasensekret-Proben sowohl von Gesunden als auch von Patienten, die an chronischer Rhinosinusitis litten. Die Proben wurden entweder durch eine Nasenspülung oder durch eine endoskopische Biopsie gewonnen. Die Identifizierung erfolgte mikroskopisch und mittels PCR mit anschließender Sequenzierung. Insgesamt stellte *Aspergillus* spp. mit 52,4 % die am häufigsten gefundene Spezies dar. Der Hauptanteil entfiel mit 17,1% auf *A. fumigatus* [15]. Vennewald et al. untersuchten 132 Gewebeproben aus paranasalen Sinus, die durch endoskopische Operation von 117 immunkompetenten Patienten gewonnen worden waren auf das Vorliegen einer Pilzbesiedelung. Es waren 34 Gewebeproben (25,5%) positiv. In 17 davon (50%) wurde *A. fumigatus* nachgewiesen. In sechs Proben wurde DNA anderer *Aspergillus*-Spezies identifiziert, darunter *A. terreus* und *A. glaucus* [93]. Auch Blitzer et al. sowie Ferreiro et al. stellten *A. fumigatus* als Hauptverursacher mykotischer Sinusitis heraus, ohne Zahlenangaben zu machen [8, 28].

In 23 der 81 hier untersuchten Proben konnte keine *Aspergillus*-spezifische DNA nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die Konzentration der Pilz-DNA unter der Detektionsgrenze von 0,1 fg Plasmid-

DNA lag. Zudem lässt sich nicht ausschließen, dass es sich in den betreffenden Proben um fokale Infektionen handelt, wodurch die Menge an Pilz-DNA im Probenmaterial sehr unterschiedlich verteilt sein kann und einer Anzahl von zwei Schnitten à 5 µm dadurch entgehen kann [6].

In den übrigen 10 Proben konnte das nachgewiesene Amplifikat der Aspergillus-PCR nicht durch die Sequenzierung identifiziert werden, so dass von einer unspezifischen Amplifikation ausgegangen wurde. Da Mikroskopie und Differenzierung verschiedener Schimmelpilze aufgrund histologischer Ähnlichkeiten teilweise Schwierigkeiten bereitet, könnte möglicherweise auch andere Pilzspezies das Bild eines „fungus balls“ hervorgerufen haben. So kann eine Hyalohyphomykose z.B. durch *Pseudallescheria boydii* oder *Fusarium spp* hervorgerufen werden [6, 39, 40, 74]. Bislang wurde nicht untersucht, ob DNA dieser Pilzarten mit der Aspergillus-PCR amplifiziert wird. Eine weitere Ursache für die nicht identifizierbaren Sequenzen ist, wie Bretagne et al. beschrieben, möglicherweise die Tatsache, dass in der NCBI-GenBank (National Center of Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) häufig keine Sequenzen zum Abgleich vorhanden sind und deshalb ein Amplifikat nicht zugeordnet werden kann [6, 10].

4.1.2 Zygomyceten-PCR

Mit der Zygomyceten-PCR konnte in einer der 81 Proben DNA eines Zygomyceten, nämlich *Rhizomucor pusillus*, amplifiziert werden. In der Literatur wird die rhino-orbito-zerebrale Form als die häufigste unter den Zygomykosen hervorgehoben [66]. 70% der kulturell identifizierten Fälle werden durch *Rhizopus spp.* verursacht [107].

Rhizomucor pusillus ist ein ubiquitär vorkommender Pilz, der in der Luft, im Kompost, im Restmüll und sogar in einer Reihe von Lebensmitteln, wie z.B. Nüsse, Bohnen und Getreide gefunden werden kann. *Rhizomucor pusillus* ist nur in seltenen Fällen Ursache einer Zygomykose. Er verursacht opportunistische Infektionen bei dafür prädisponierten Patienten. Dazu zählen

v. a. Patienten mit Leukämie oder Neutropenie bei aplastischer Anämie [34, 83, 88, 101]. Am häufigsten manifestiert sich eine Infektion mit *Rhizomucor pusillus* als pulmonale oder disseminierte Form, die rhinocerebrale Form ist in diesem Patientenkollektiv äußerst selten [21, 88, 101]. Obwohl *Rhizomucor* für gesunde Individuen ein geringes pathogenes Potential aufweist kann er bei immunsupprimierten Patienten hochakut und fulminant verlaufende Krankheitsbilder auslösen [88, 96]. *Rhizomucor pusillus* zeigt die Fähigkeit zur Angioinvasion und kann dadurch zur disseminierten Infektion führen. Die Pathogenität dieses Organismus ist an seine Wärmetoleranz gekoppelt, die ihm ein Wachstum selbst bei Temperaturen über 39°C ermöglicht. Die Virulenzfaktoren des Pilzes sind weitestgehend unbekannt [68]. Der einmalige Nachweis eines Zygomyceten aus den untersuchten Proben spricht gegen eine konstante Kontamination der Biopsien oder des zur Einbettung verwendeten Paraffins. Trotz ihres ubiquitären Vorkommens gibt es wenige Berichte über den Nachweis von Zygomyceten in Biopsien aus dem Nasenrachenraum. Buzina et al. wiesen in einer von 233 Proben DNA von Zygomyceten, in diesem Fall *Rhizopus oryzae*, nach [15]. Zygomyceten sind also eher nicht als physiologische Flora des Respirationstraktes anzusehen, so dass der Nachweis spezifischer DNA, sofern eine Kontamination ausgeschlossen ist, als Hinweis auf eine Infektion gedeutet werden sollte. Die Zygomyceten-PCR wird zur Diagnostik bei immunsupprimierten Patienten eingesetzt. Bislang war unklar, wie häufig mit Amplifikationen aufgrund des ubiquitären Vorkommens gerechnet werden muss. Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass der Nachweis Zygomyceten spezifischer DNA aus den Sinus eine Rarität ist und immer als Hinweis auf eine Zygomycose der Atemwege zu deuten ist.

In 31 der 81 Proben (38%) konnten Amplifikate mit 97–99% Homologie zu diversen *Basidiomycota* nachgewiesen werden. Der Stamm der *Basidiomycota* stellt eine sehr heterogene Gruppe dar, zu der eine Vielzahl von Pilzen gehören. *Basidiomycota* sind ubiquitär vorkommende Pilze, die am Boden und durch beständige Aufwirbelungen auch in der Luft nachweisbar sind. In der Literatur finden sich mit Ausnahme von *Cryptococcus* kaum Hinweise auf

humanpathogene *Basidiomycota* [19]. Buzina et al. wiesen bei 23,8% der Patienten mit chronischer Rhinosinusitis und 13% der gesunden Kontrollpersonen DNA von *Basidiomycota* in den Nasennebenhöhlen nach [15]. In einer von Buzina et al. 2003 publizierten Untersuchung konnte DNA des Basidiomyzeten *Schizophyllum commune* bei Patienten mit Sinusitis oder „fungus balls“ häufiger gefunden werden als zuvor angenommen wurde [16]. Wie die Autoren herausstellten, bedeutet der Nachweis von DNA von *Basidiomycota* nicht zwingend, dass diese Pilze Krankheitserreger sind. Viel eher muss davon ausgegangen werden, dass diese Pilze durch Inspiration in den Nasenrachenraum gelangen [15]. In Anlehnung an den von Riede beschriebenen und von Vennewald et al. aufgegriffenen Entzündungsprozess des Respirationstraktes lässt sich folgende Hypothese aufstellen [71, 93]: Sporen der Basidiomyzeten gelangen bei der Inspiration permanent in den Nasenrachenraum und werden durch die mukoziliäre Clearance und die physiologische Schleimhautbarriere beim Gesunden an einer Kolonisierung gehindert. Bei Vorliegen eines „fungus balls“ findet sich eine chronische Entzündungsreaktion, die mit vermehrter Schleimproduktion und Verminderung der Clearance-Mechanismen einhergeht. Es kommt zu einer Obstruktion des betroffenen Sinus. Auf diese Weise können *Basidiomycota* persistieren und sind deshalb in erheblichem Umfang im Respirationstrakt nachweisbar. Ob eine Kolonisation stattfindet bleibt unklar. Somit wäre der Nachweis als vorübergehende, akzidentielle Anwesenheit von *Basidiomycota* im menschlichen Nasen-Rachen-Raum zu werten. Es bleibt zu untersuchen, inwieweit *Basidiomycota* zur Pathogenese beitragen können.

Mittels Zygomyceten-PCR konnte in einer Probe eine Sequenz amplifiziert werden, die zu 100% mit der des Hautkeims *Trichosporum cutaneum* identisch ist. *Trichosporum cutaneum* (auch als *T. beigelii* bezeichnet) ist als Verursacher der Piedra alba, einer harmlosen Haarschaftinfektion, bekannt, die man zumeist in Ländern mit tropischem Klima vorfindet. Diese Spezies ist in der Umwelt weit verbreitet und kann sowohl auf intakter Haut als auch in der oralen Mikroflora nachgewiesen werden [98]. Jedoch finden sich in den letzten Jahren

zunehmend auch Beschreibungen von disseminierten, letal verlaufenden Infektionen bei immunsupprimierten Patienten [44]. Obwohl den Pilzinfektionen angesichts teils hoher Letalität zunehmend Bedeutung zugemessen wird, ist über die Epidemiologie dieses opportunistischen Keims bislang wenig bekannt [31]. Mangels Angaben zur klinischen Symptomatik und eventuell zugrunde liegender Erkrankungen der Patienten, deren Untersuchungsmaterial zur Verfügung gestellt wurde, können an dieser Stelle nur Mutmaßungen über die Bedeutung des Nachweises von *Trichosporum cutaneum* angestellt werden: am ehesten handelt es sich um den akzidentellen Nachweis bei Kontamination aus dem Oropharynx. Denkbar wäre auch eine Kontamination der Gewebeprobe mit Hautflora im Rahmen der chirurgischen Intervention.

4.1.3 Aspergillus- und Zygomyceten-PCR

Mittels Aspergillus- und Zygomyceten-PCR konnte in 62 Proben (77 %) Pilz-DNA nachgewiesen werden. In einer dieser Proben war sowohl DNA von *A. fumigatus* als auch von *Rhizomucor pusillus* nachweisbar. In der Literatur gibt es nur wenige Berichte über die gleichzeitige Infektion mit verschiedenen Spezies [95]. Hierbei ist die Identifizierung der beteiligten Spezies wegen teilweise vorliegender Resistenzen gegen Antimykotika enorm wichtig.

In 18 Proben (22%) fand sich DNA von *A. fumigatus* und verschiedener, nicht weiter identifizierter Basidiomyceten. Buzina et al. wiesen in ihrer Arbeit in einigen Proben bis zu 9 verschiedene Pilzspezies pro Patient nach [15]. Wobei, wie unter 4.1.2 ausgeführt, aus dem Nachweis von DNA verschiedener *Basidiomycota* keineswegs auf eine pathogene Bedeutung geschlossen werden kann. Möglicherweise begünstigt eine chronische Rhinosinusitis, wie sie beim Krankheitsbild des „fungus ball“ vorliegt, die Besiedlung bzw. Anwesenheit von *Basidiomycota*.

In 35% der Fälle konnte ausschließlich DNA von *A. fumigatus* detektiert werden. In 14 Fällen blieb die Aspergillus-PCR negativ während mittels Zygomyceten-PCR in 13 Proben DNA von *Basidiomycota* und in einer DNA von

Trichosporon cutaneum nachgewiesen werden konnte. Aus 19 Proben (23%) konnte weder Aspergillus- noch Zygomyceten-spezifische DNA nachgewiesen werden. Wie unter 4.1.1 ausgeführt könnten hierfür eine zu geringe Pilzkonzentration oder eine fokale Infektionen verantwortlich sein.

Eine Kontamination der Proben während der Bearbeitung wurde durch sorgfältiges Arbeiten an räumlich getrennten Arbeitsplätzen und unter der Sterilbank verhindert. Die zahlreich mitgeführten Negativkontrollen, bestehend aus sterilem Wasser, blieben alle negativ. Es kann daher angenommen werden, dass die in den Proben nachgewiesene Pilz-DNA aus den untersuchten Proben stammt und nicht durch Kontamination mit ubiquitär vorkommenden Pilz-Sporen hervorgerufen wurde.

4.1.4 β -Globin- und GAPDH-PCR

Aus zwei der 81 Gewebeproben konnte auch bei wiederholter Extraktion und erneuter nested GAPDH-PCR keine amplifizierbare humane DNA nachgewiesen werden. Die Isolierung von DNA aus in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Probenmaterial ermöglicht die Untersuchung archivierter Biopsien. Nachteilig an der Formalinfixierung ist die Zerstörung der Nukleinsäure, welche zu falsch negativen Ergebnissen führen kann [109]. Zudem induziert Formalin im Probenmaterial Kreuzverbindungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen, die teilweise nicht mehr reversibel sind und so die PCR-Reaktion inhibieren [4]. Dabei korreliert die Abnahme des PCR-Signals mit der Dauer der Fixierung in Formalin [72]. Ohara et al. stellten fest, dass die Sensitivität der PCR nicht nur mit der Dauer der Fixierung abnimmt, sondern auch mit der Länge des DNA-Produkts, da Formalin die DNA in kleine Fragmente bricht [63]. Williams et al. wiesen auf einen weiteren Effekt hin, den die Fixierung in Formalin hervorrufen kann: In einer kontrollierten Studie mit gefrorenem und in Formalin fixiertem Material konnte eine Häufung von nicht-reproduzierbaren Sequenzveränderungen im formalinfixiertem Material beobachtet werden [103]. Diese Beobachtungen zeigen, dass sowohl Sensitivität als auch Spezifität einer molekularbiologischen Untersuchung von

konserviertem Gewebe stets von deren Behandlung bis zur Einbettung abhängig ist.

4.1.5 Vergleich mit den Wiener Ergebnissen

Für die PCR, die in Wien durchgeführt wurde, wurden Universalprimer für die 28S rDNA nach Sandhu et al. verwendet [76]. Diese amplifizieren ein 260 bp langes Fragment. Anschließend erfolgte ohne vorherige Klonierung eine Sequenzierung. Dabei wurden Homologien von mindestens 98% zu wenigstens 75% der Länge des Amplifikats als signifikant betrachtet [105]. Bei einer Fragmentlänge von 260 bp bedeutet eine Homologie zu 75% der Länge des Amplifikats, dass die Übereinstimmung von 195 Basenpaaren als ausreichend für eine Identifizierung angesehen wird. Die Limitierungen dieses Vorgehens werden anhand der in dieser Studie verwendeten PCR zum Nachweis Zygomyceten spezifischer DNA analysiert. Wie unter 2.3.2 beschrieben ist die 18S Untereinheit der ribosomalen DNA die Zielsequenz der verwendeten Zygomyceten-PCR. Die Region ist innerhalb der Gruppe der Erreger von Mucormykosen konserviert. Bei der nested-PCR wird durch das Primerpaar ZM 1 und ZM 3 ein 176 bis 177 bp langes Fragment des ersten Produkts begrenzt. Dabei ist ZM 1 zu den Positionen 722 – 741 und ZM 3 zu 898 – 876 der 18 S rDNA von *Cunninghamella* spp. komplementär [6]. In Abbildung 12 werden die von den Primern ZM 1 und ZM 3 amplifizierten DNA-Abschnitte neun verschiedener *Zygomycota* gegenüber gestellt. Position 1 bis 20 stellt die Primerregion von ZM 1 dar; der Primer ZM 3, beginnend am 3'-Ende, ist komplementär zu den Positionen 158 bis 180. Schwarze und blaue Buchstaben bedeuten fehlende Übereinstimmung, rote Buchstaben zeigen übereinstimmende Nukleotidpositionen an. Nur bei 100% Homologie zu einer 18S rDNA Sequenz eines Zygomyceten wurde ein durch die Zygomyceten-PCR amplifiziertes Produkt als positiv gewertet. Ginge man von nur 75% Homologie aus, würde eine Übereinstimmung von 132bp statt 177 bp zur Identifizierung ausreichen. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass dann eine eindeutige Zuordnung unmöglich wird. Eine Homologie von 98% zu 75% der Gesamtlänge

des Amplifikats kann daher nicht als ausreichend für eine sichere Identifizierung angesehen werden.

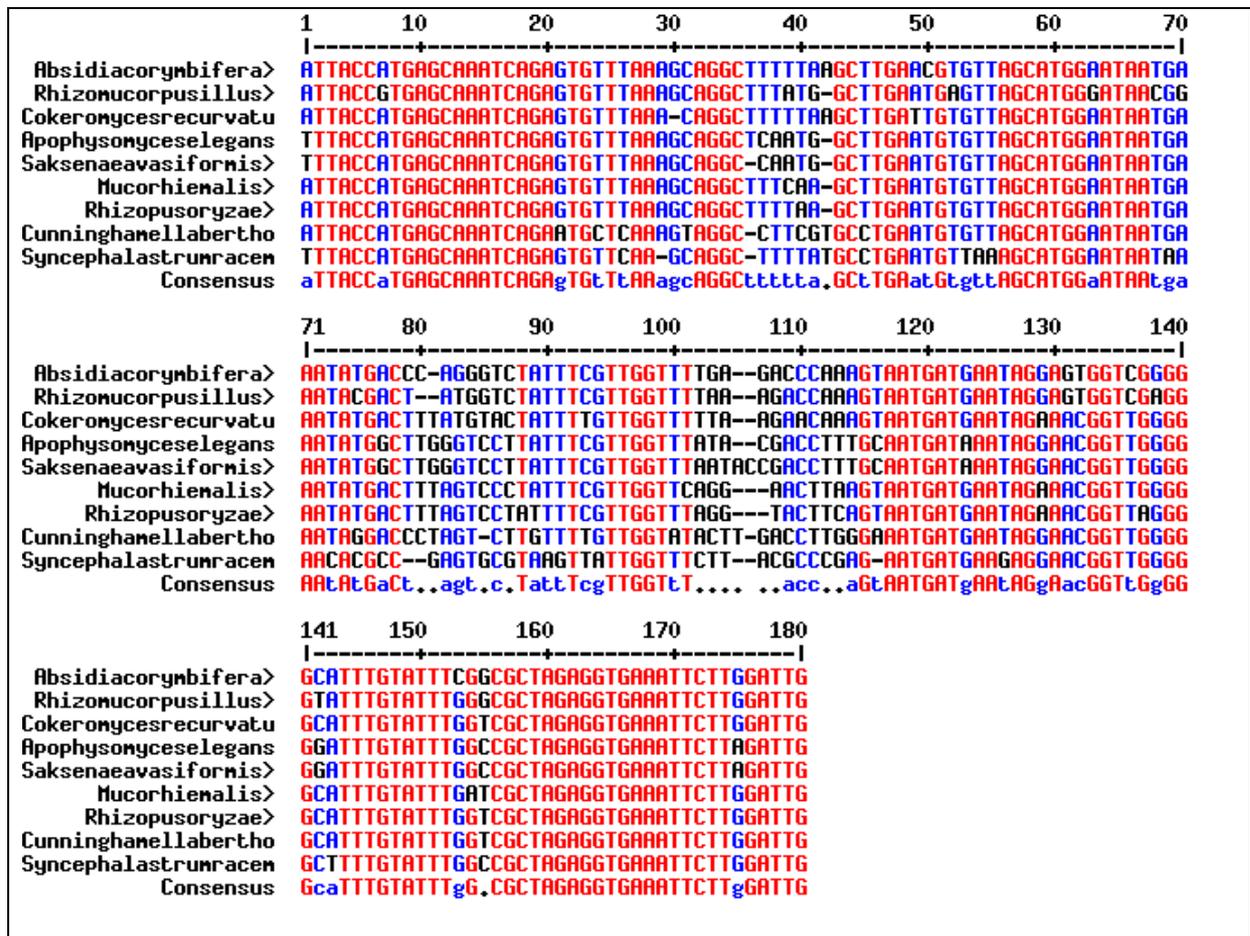


Abbildung 12: Alignment der durch die Primer ZM 1 und ZM 3 amplifizierten 18S rDNA-Sequenz von Zygomyceten nach Corpet [20], übernommen aus Bialek et al. [6].

Die Verwendung von Universalprimern ermöglicht die Amplifizierung eines sehr breiten Spektrums an Pilz-DNA, d.h. die PCR ist sehr sensitiv. Willinger et al. gaben die Sensitivität ihrer PCR im Vergleich zur Histopathologie mit 100% aus frischem Probenmaterial und 87,7% aus in Paraffin eingebetteten Proben an [105]. Auffällig ist, dass mit der PCR in Wien immer nur eine Pilzspezies identifiziert werden konnte (siehe Tabelle 19). Wie bereits dargestellt, ist die Anwesenheit von DNA mehrerer Pilzarten aber keineswegs auszuschließen, sondern eher anzunehmen. Universalprimer würden die DNA verschiedener Pilze mit ähnlicher Basenpaarlänge amplifizieren, so dass die Darstellung im Ethidiumbromid-gefärbtem Gel keine Differenzierung ermöglicht. Die

Sequenzierung ohne vorherige Klonierung könnte zu einer unlesbaren oder einer zufälligen Sequenz führen. Es verwundert daher nicht, dass 16 Amplifikate in der Wiener Studie nicht identifiziert werden konnten. Hier fanden sich Sequenzüberlagerungen oder unlesbare Sequenzen, die eine Zuordnung zu einer Pilzspezies nicht möglich machten. Wie Tabelle 18 zeigt, konnte in sechs (37,5%) dieser für Wien nicht identifizierbaren Proben sowohl mittels Aspergillus- als auch mit der Zygomyceten-PCR spezifische DNA nachgewiesen werden. In zwei Proben wurde DNA von *Basidiomycota* nachgewiesen und in weiteren zwei Proben blieben beide PCRs negativ. In fünf dieser 16 nicht identifizierbarer Proben konnte mittels Aspergillus-PCR DNA von *A. fumigatus* nachgewiesen werden, in einer Probe DNA von *A. flavus*.

Tabelle 18: Ergebnisse der Aspergillus- und Zygomyceten-PCR in den Fällen, in denen mit der Wiener PCR die DNA nicht identifizierbar war.

n	Wien-PCR	n	Aspergillus-PCR	Zygomyceten-PCR
16	nicht identifizierbar	2	negativ	negativ
		6	<i>A. fumigatus</i>	Basidiomyzet
		2	negativ	Basidiomyzet
		5	<i>A. fumigatus</i>	negativ
		1	<i>A. flavus</i>	negativ

Es ist weiterhin möglich, dass die Anwesenheit von DNA ubiquitärer Pilzspezies bei Verwendung universeller Primer die Detektion *Aspergillus*-spezifischer DNA stört bzw. inhibiert. Und zwar unter der Vorstellung, dass die verwendeten Primer U1 und U2 unspezifisch an Nukleotide ubiquitärer Pilze binden und deren DNA vervielfältigen und so die Amplifikation *Aspergillus*-spezifischer DNA verhindern. In der Literatur finden sich keine Studien, die dieses Phänomen für die Amplifikation von pilzspezifischer DNA benennen. Allerdings stellten van Burik et al. fest, dass sie mit ihrer PCR, deren universelle Primer auf die kleine Untereinheit ribosomaler DNA ausgerichtet sind, aus den getesteten Proben nicht alle Pilze detektieren konnten, die mit einem anderen Primer-Paar nachgewiesen werden konnten und vice versa [14]. Dies ist möglicherweise als Hinweis auf oben beschriebene Hypothese zu werten.

Wie in Tabelle 13 im Ergebnisteil dargestellt, konnte mittels *Aspergillus*-PCR insgesamt in 48 von 81 Proben *Aspergillus*-spezifische DNA nachgewiesen werden (59,3%), wohingegen mit der in Wien durchgeführten PCR nur 29 von 81 Proben (35,8%) als *Aspergillus* positiv erkannt wurden. In 26 Proben ergaben beide PCRs ein übereinstimmendes Ergebnis mit Nachweis *Aspergillus*-spezifischer DNA. Demnach verbleiben 22 Proben, in denen mittels *Aspergillus*-PCR *Aspergillus*-spezifische DNA nachgewiesen, wohingegen mit der PCR in Wien in diesen Proben keine *Aspergillus*-spezifische DNA amplifiziert werden konnte. Tabelle 11 stellt die unterschiedlichen Ergebnisse dieser 22 Proben vergleichend dar. Demnach war aus insgesamt 12 Proben die amplifizierte DNA nicht identifizierbar; in zwei Proben war keine DNA nachweisbar. In acht Proben (36%), aus denen die Wien-PCR keine DNA von *Aspergillus* ssp. amplifizieren konnte, wurde stattdessen DNA verschiedener anderer Pilzspezies nachgewiesen: Den Nachweis von *Itersonilia perplexans*, *Strobilurus trullisatus* sowie *Blumeria graminis* führten Willinger et al. auf eine exogene Kontamination des Probenmaterials respektive die Inhalation von Sporen ohne nachfolgende Infektion zurück [105]. In der Literatur lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis dieser Pilze und Infektionen beim Menschen finden. Den Nachweis der Sprosspilze *Malassezia* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp., *Trichosporon* spp. sowie *Cryptococcus* spp. hielten Willinger et al. für den Indikator einer transienten Flora bzw. für eine Kontamination. Auch hier zeigten sich in der Histopathologie Hyphen, was für die Anwesenheit von Fadenpilzen, nicht aber für die von Sprosspilzen typisch ist [105]. Wie Ponikau et al. zeigten, finden sich auch im Nasensekret gesunder Individuen verschiedenste Pilzspezies [65]. Es muss daher angenommen werden, dass oben aufgeführte Pilze in den menschlichen Nasennebenhöhlen vorübergehend anwesend sind ohne diese zu kolonisieren. Die Amplifikation der DNA des die „fungus balls“ hauptsächlich verursachenden Pilzspezies, *A. fumigatus*, gelingt aber durch die Verwendung universeller Primer nicht.

Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass der Einsatz zwei spezifischer PCRs der PCR mit universellen Primern überlegen ist. Die Zygomyceten-PCR mit Zielsequenz in der 18S Untereinheit der ribosomalen DNA amplifiziert keine *Aspergillus*-spezifische DNA. Die *Aspergillus*-PCR weist mitochondrialen DNA von *Aspergillus fumigatus* nach, amplifiziert aber keine Zygomyceten-spezifische DNA. Somit nutzt man ein System zweier PCRs, deren Ergebnisse sich ergänzen.

4.2 Aspergillus-PCR mit verschiedenen Pilzspezies und Spezifität der PCR-Verfahren

Anhand des jeweiligen nested PCR-Produkts konnten die Sequenzen von *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* und *A. flavus* identifiziert und vergleichend dargestellt werden. Wie unter 3.2.1 erörtert wurde, variiert die Länge der PCR-Produkte zwischen 113 bp und 163 bp, so dass sie im Agarosegel unterschiedlich weit wandern und identifiziert werden können. Es wird aber vermutlich nicht die DNA aller *Aspergillus*-Stämme identifiziert; so konnte in keinem Fall die DNA von *A. glaucus* amplifiziert werden.

In der klinischen Praxis ist die Differenzierung in verschiedene *Aspergillus*-Spezies von Bedeutung, da sich daraus für die Behandlung von Infektionen unterschiedliche Konsequenzen ableiten: Während *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. niger* nach momentaner Resistenzlage vorwiegend mittels (liposomalem) Amphotericin B therapiert werden, ist dies beim Nachweis von *A. terreus* nicht indiziert, da diese Spezies eine natürliche Resistenz gegen Amphotericin B aufweist [47, 89, 100]. In in-vitro-Studien erwies sich *A. terreus* deutlich sensibler auf Itraconazol als auf Amphotericin B [61]. Lass-Flörl et al. untersuchten Epidemiologie und outcome von *A. terreus*-Infektionen über einen Zeitraum von 10 Jahren in der Medizinischen Universitätsklinik Innsbruck. Dabei wiesen sie in 30% der Invasiven Aspergillosen *A. terreus* nach. Die *A. terreus*-Infektionen waren schnell progredient und disseminierten in 63% der Fälle [47]. Auch Baddley et al. berichteten über eine erhöhte Anzahl an disseminierten, letal verlaufenden Infektionen mit *A. terreus* [3]. Anhaltende

Immunsuppression, häufige Dissemination und der Mangel an effektiver antifungaler Therapie machen Infektionen mit *A. terreus* zu schlecht therapierbaren Mykosen [43, 87, 100]. Die Identifizierung der *Aspergillus*-Spezies kann daher entscheidend dazu beitragen, die Therapie zu optimieren. Es zeigte sich, dass nicht nur die DNA verschiedener *Aspergillus*-Spezies amplifiziert werden kann, sondern auch DNA von *Coccidioides posadasii* und *Histoplasma capsulatum*. Die *Aspergillus*-PCR kann daher zum Screening auf die Anwesenheit der DNA verschiedener Pilzarten verwendet werden. Mittels Sequenzierung kann das Amplifikat identifiziert werden. Die DNA von *Candida*-Arten wie *C. dubliensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* und *C. glabrata*, von *Zycomycota* und *Basidiomycota* wird mittels *Aspergillus*-PCR nicht amplifiziert.

4.3 Identifizierung von *Aspergillus*-Stämmen

Es wurden 17 verblindete und kodierte Konidien-Suspensionen von *Aspergillus*-Stämmen mittels *Aspergillus*-PCR untersucht. Das Ergebnis stellt Abbildung 9 graphisch dar. Übereinstimmend mit den suspendierten Konidien wurde in vier Proben *A. flavus*- und in drei *A. terreus*-spezifische DNA nachgewiesen. Von den vier *A. niger*-Konidien enthaltenden Suspensionen wurden nur zwei als solche identifiziert. Laut Index fungorum gibt es einen *Aspergillus tubingensis*, früher auch *A. niger var. tubingensis*, dessen mitochondriale DNA sequenziert wurde (GenBank accession number DQ217399). Vergleicht man die Sequenz von *A. niger*, *A. niger var. tubingensis* und dem in dieser Studie sequenzierten *A. niger* miteinander (siehe Abbildung 13 im Anhang), stellt sich heraus, dass es sich um drei verschiedene Sequenzen handelt. Der Primer AM 2 (Position 443 – 464) ist zu allen drei Sequenzen komplementär. AM 3 (Position 509–531) weist an Position 525 und 527 zwei mismatches zu allen drei Sequenzen auf. Der Primer AM 1 wurde umgedreht, also die komplementäre Sequenz gelesen, beginnend am 3'-Ende. AM 1 ist komplementär zu Position 672 bis 694. Dabei bestehen an den Positionen 674, 675 und 682 je ein mismatch zwischen der Sequenz von *A. tubingensis* und *A. niger* zum Primer AM 1. Das nested PCR-Produkt von *A. tubingensis* ist 186 bp lang. Bei dem von uns sequenzierten Amplifikat fehlen 23 Basen, damit ist dieses nested PCR-Produkt

163 bp lang. Bei der Sequenz von *A. niger* fehlen zwischen Position 554 und 620 alle Basen, sodass das Produkt nur 120 bp lang ist. Die aufgelisteten mismatches im Bereich der Primer AM 3 und AM 1 können zu einer verminderten Bindung oder zur Fehlablesung führen. Es ist nicht auszuschließen, dass es innerhalb der als *A. niger* bezeichneten Gruppe von Pilzen weitere Sequenzunterschiede gibt, die dazu führen, dass die verwendeten Primer gar nicht erst binden können und somit nicht zu einer Amplifikation führen. Es gibt offensichtlich verschiedene Varianten von *A. niger*, zwischen denen in der klinischen Routine nicht unterschieden wird. Dies erklärt, dass nur die DNA von zwei der vier *A. niger*-Isolate mit der Aspergillus-PCR amplifiziert werden konnte.

Alle vier DNA von *A. fumigatus* enthaltenden Suspensionen konnten richtig identifiziert werden. Zusätzlich wurde fälschlicherweise in einer weiteren Suspension DNA von *A. fumigatus* nachgewiesen, was am ehesten auf eine Kreuzkontamination während der Bearbeitung zurückzuführen ist. Allerdings ist auch eine Kontamination bei der Herstellung der Pilzsuspensionen denkbar. DNA von *A. glaucus* kann mit dieser Aspergillus-PCR nicht amplifiziert werden.

4.4 Aspergillus-Ringversuch

Es wurden 50 verblindete Proben untersucht, die entweder *Aspergillus*-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten oder steriles Wasser. In 22 Proben konnte mittels Aspergillus-PCR DNA unterschiedlicher *Aspergillus*-Spezies nachgewiesen werden, wohingegen insgesamt 24 Proben *Aspergillus* positiv waren. Unabhängig von der Konzentration wurde in allen Fällen (100%) *A. fumigatus*-spezifische DNA nachgewiesen. Zudem fand sich in zwei weiteren Proben DNA von *A. fumigatus*. Allerdings waren die dazugehörigen Banden im Agarosegel im Verhältnis zu den übrigen *A. fumigatus* enthaltenden Proben schwach, so dass für diese falsch positiven Befunde am ehesten Kontaminationen ursächlich sind. Der Vorgabe entsprechend konnten alle acht Proben, die DNA von *A. flavus* enthielten, korrekt identifiziert werden (100%).

In acht Proben war DNA von *A. terreus* enthalten. Nur die Hälfte der *A. terreus* enthaltenden Extrakte ergab eine positive PCR bzw. ein Amplifikat, das sequenziert wurde. Bei den vier nicht identifizierten Proben fanden sich Sequenzüberlagerungen, die eine Zuordnung nicht eindeutig möglich machten. Insgesamt ist die Aussagekraft eines solchen Ringversuchs aus verschiedenen Gründen zweifelhaft: Die Extrakte enthielten DNA von bis zu 10000 CFU. Die Bearbeitung solch hoher DNA-Konzentrationen entspricht nicht der Praxis, denn humane Biopsien enthalten in der Regel geringere Konzentrationen an DNA. Der Umgang mit diesen Proben erhöht auch bei sorgfältigem Arbeiten die Wahrscheinlichkeit von Kontaminationen. Hinzu kommt, dass im Labor normalerweise eine weitaus kleinere Anzahl an Proben bearbeitet wird und die Gerätschaften nicht für solche Probenmengen ausgelegt sind. Auch dies kann dazu führen, dass eher Fehler unterlaufen, als wenn mit der üblichen Anzahl an Proben gearbeitet wird. Zeigten sich im Gellauf schwache Banden, wurden diese nicht sequenziert, sondern als unspezifische Amplifikation gewertet. Im Falle von Patientenproben hätte man jedes zweifelhafte Ergebnis sequenziert, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Der Ringversuch zeigt jedoch eine hohe Sensitivität der hier verwendeten *Aspergillus*-PCR, denn diese ist in der Lage, relativ geringe Mengen an DNA zu detektieren (DNA von 10 CFU).

4.5 Chancen und Limitierungen der PCR zum Nachweis von Pilzen im Allgemeinen

Durch die ubiquitäre Anwesenheit von *Aspergillus*-Konidien können Kontaminationen auftreten, die zu falsch positiven Ergebnissen führen. Bretagne et al. erhielten in 23% ihrer untersuchten Proben ein positives Ergebnis ohne dass eine invasive pulmonale Aspergillose vorlag [10]. In einer von Löffler et al. durchgeführten Studie waren 8% der durchgeführten PCR-Ansätze kontaminiert. Davon handelte es sich in 3,3% um Kontaminationen der Negativkontrollen während der DNA-Extraktion und in 4,7% der Fälle konnte eine Verunreinigung der Reaktionsansätze während des Amplifikationsprozesses nachgewiesen werden. Als kontaminierende Pilz-Spezies konnten *A. fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Acremonium* spp.

nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass kommerziell erhältliche Produkte wie Zymolyase-Pulver oder 10x-Puffer Pilz-DNA enthalten und so zu einer Kontamination des PCR-Ergebnisses führen können [52].

Wie problematisch die Bewertung einer positiven PCR auf *Aspergillus*-DNA ist, zeigt eine Studie von Lass-Flörl et al., die hämatologisch-onkologische Patienten vor Chemotherapie und antimykotischer Therapie mittels PCR aus Vollblut untersuchten. Bei 28 von 121 Patienten (23%) war *Aspergillus*-DNA nachweisbar. Die Autoren wiesen darauf hin, dass bei 16 dieser 28 Patienten (57%) nur einmal *Aspergillus*-DNA im Blut nachgewiesen wurde und dies nicht mit den klinischen Zeichen einer invasiven Aspergillose korrelierte. Inwieweit dies auf Kolonisation z.B. des Bronchialsystems zurückzuführen war, blieb offen [46]. Das macht das grundsätzliche Problem der Methode, zwischen Kolonisierung/Anwesenheit von Pilzen respektive fungaler DNA und Infektion zu unterscheiden, deutlich. Einzelne positive Proben müssen nicht Ausdruck einer Infektion sein, und es ist nicht klar, wie viel positive PCR-Befunde mit welcher Methode notwendig sind, um eine Infektion nachzuweisen. Einen Ausweg aus diesem Dilemma bietet möglicherweise die „Real-time-PCR“. Diese Technik bietet den grundsätzlichen Vorteil, dass die Amplifikation der DNA mit der unmittelbaren Fluoreszenz-Detektion des Amplifikats in einem Arbeitsschritt innerhalb weniger Stunden durchgeführt werden kann. So wird die rasche Quantifizierung der DNA-Menge des Pilzes sowie der Nachweis der verursachenden Pilzspezies möglich. Die Quantifizierung könnte die Differenzierung zwischen Kontamination und tatsächlicher Aspergillose ermöglichen und so eine Möglichkeit des therapeutischen Monitoring eröffnen [10]. Spiess et al. entwickelten eine LightCycler-PCR zum Nachweis und Quantifizierung von *A. fumigatus*-DNA in BAL-Flüssigkeit und Blut. Zwar ist die Sensitivität dieser Methode bei Hochrisikopatienten mit invasiver pulmonaler Aspergillose etwas geringer als die der verwendeten nested-PCR, doch erlaubt sie eine Quantifizierung der Pilzmenge [84]. Inwieweit daraus Schlüsse zum Verlauf der Infektion gezogen werden können, werden zukünftige Studien zeigen müssen.

Bedeutsam ist der *Aspergillus*-DNA-Nachweis möglicherweise im Hinblick auf die endogene Reaktivierung einer *Aspergillus*-Besiedlung nach Immunsuppression. Gemeint ist damit, dass es ausgehend von einer bestehenden Besiedlung oder Infektion der Schleimhaut der Nasennebenhöhlen oder des Bronchialsystems durch die Immunsuppression zu einer invasiven Aspergillose kommen kann. Dieser Infektionsweg sollte zum in der Regel exogenen Infektionsweg zunehmend berücksichtigt werden. Einsele et al. untersuchten den prädiktiven Wert einer Kolonisation des unteren Respirationstrakts mit *Aspergillus* spp. anhand des Nachweises von *Aspergillus*-DNA in BAL-Flüssigkeit bei Patienten vor Knochenmarkstransplantation. Die Autoren fanden, dass der negative und positive prädiktive Wert einer *Aspergillus*-DNA positiven BAL für die spätere Entwicklung einer invasiven Aspergillose bei 63% bzw. 98% lag. Die Empfindlichkeit betrug 100%, wenn die Patienten mit einer wahrscheinlichen nosokomialen Infektionsquelle ausgeschlossen wurden [26].

In der Literatur sind sehr viele verschiedene PCR-Verfahren zum Nachweis von Pilzinfektionen und insbesondere von Aspergillosen beschrieben worden. Aufgrund teilweise großer methodischer Unterschiede ist die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Arbeiten gering. So bleibt z.B. der Einfluss verschiedener DNA-Extraktionsmethoden, unterschiedlicher Primersequenzen und Zielregionen sowie verschiedener PCR-Temperaturprofile nach wie vor unklar [12]. Auch gibt es bislang keine Aussagen darüber, welches klinische Material am besten zur Diagnostik mittels PCR geeignet ist. Aufgrund dieser Schwierigkeiten gibt es bis heute kein kommerziell erhältliches Standard-Protokoll [13].

PCR-Verfahren stellen mittlerweile einen wesentlichen Teil des klinisch-diagnostischen Mosaiks dar, welches sich aus der Klinik des Patienten, mikrobiologischen und serologischen Untersuchungsergebnissen sowie der Bildgebung zusammensetzt. Doch trotz der Fortschritte, die in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Molekularbiologie gemacht wurden, bleibt weiter

ungeklärt, ob die Kosten-Nutzen-Analyse für oder gegen den Einsatz einer PCR zum Nachweis von Pilz-DNA spricht. In Bezug auf hämatologisch-onkologische Patienten fehlen Studiendaten, die eine Senkung der Mortalität und/oder Letalität durch Einsatz der PCR-Diagnostik beweisen [13].

4.6 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aspergillus-PCR mit Zielsequenz in der mitochondrialen DNA von *Aspergillus* spp. mit einer universellen Pilz-PCR mit Zielsequenz in der fungalen 28S rDNA verglichen. Dabei erwies sich die Aspergillus-PCR als überlegen. Die Anwesenheit apathogener universeller Pilzsporen führt zu Amplifikationen in der universellen Pilz-PCR und scheint den Nachweis *Aspergillus*-spezifischer DNA zumindest teilweise zu inhibieren.

Weiterhin konnte durch Sequenzierung der Amplifikate gezeigt werden, dass mittels Aspergillus-PCR neben DNA von *A. fumigatus* auch DNA von *A. niger*, *A. terreus* und *A. flavus* nachgewiesen werden kann. Dies konnte anhand einiger verblindeter Proben sowie im Rahmen eines Ringversuches validiert werden. Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass mittels Aspergillus-PCR auch DNA von *Coccidioides posadasii* und *Histoplasma capsulatum* amplifiziert werden kann. Die Primer der Aspergillus-PCR amplifizieren aber weder DNA von Zygomyceten und Basidiomyceten noch einzelner getesteter *Candida*-Arten.

Anhand des untersuchten Probenmaterials ließ sich weiterhin feststellen, dass die Zygomyceten-PCR zur spezifischen Diagnostik von Zygomykosen geeignet ist. Die Studienergebnisse zeigen, dass es trotz des ubiquitären Vorkommens von Zygomyceten nur selten zu Amplifikationen spezifischer DNA aus Sinus-Proben kommt. Daher muss der Nachweis Zygomyceten-spezifischer DNA aus Atemwegsproben als Hinweis auf eine Zygomykose gewertet und entsprechend diagnostisch sowie therapeutisch verfolgt werden.

Erstmalig konnte im Rahmen weiterer Analysen gezeigt werden, dass mittels Zygomyceten-PCR auch DNA von Basidiomyceten amplifiziert werden kann. Mittels Sequenzierung ist eine Differenzierung von Zygomyceten-spezifischer DNA möglich. Es ist davon auszugehen, dass *Basidiomycota* aufgrund von Obstruktionen der Sinus im Nasen-Rachenraum persistieren und deshalb in den Proben in erheblichem Umfang nachweisbar sind. Der Nachweis ihrer DNA erlaubt keinen Rückschluss auf eine mögliche pathogene Bedeutung.

5. Zusammenfassung

In den letzten 25 Jahren wird ein Anstieg von invasiven Schimmelpilzinfektionen mit hoher Letalität beobachtet. Betroffen sind vorwiegend Patienten mit Grunderkrankungen, die selbst oder deren Therapie zu einer Immunsuppression führen. Die frühzeitige antimykotische Therapie wird derzeit als eine wesentliche Möglichkeit angesehen, die Letalität der Schimmelpilzinfektionen zu senken. Unverändert ist aber die frühzeitige Diagnose bei überwiegend unspezifischen Symptomen eine Herausforderung. Neben Antigennachweisverfahren wird der molekularbiologische Nachweis spezifischer DNA aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien als sehr erfolgversprechende sensitive Methode angesehen, jedoch wurden die dafür verwendeten PCR-Verfahren weder standardisiert noch miteinander verglichen.

Invasive Schimmelpilzinfektionen werden am häufigsten durch Arten der Gattung *Aspergillus*, vorwiegend *A. fumigatus*, seltener durch Zygomyceten verursacht. Die genannten Pilze kommen ubiquitär vor. Durch Inhalation gelangen ihre Sporen in die Atemwege, wo sie lokale, aber auch davon ausgehende disseminierte Infektionen hervorrufen können. Die Wirksamkeit der zur Therapie verwendeten Antimykotika ist wesentlich von der verursachenden Pilzart abhängig. Daher ist neben dem Nachweis einer Pilzinfektion die Speziesidentifizierung essenziell für den Therapieerfolg.

In dieser Arbeit wurden erstmalig PCR-Verfahren zum Nachweis von *Aspergillus*-DNA mit unterschiedlichen Zielsequenzen miteinander verglichen. Es wurden 81 paraffin-eingebettete Proben von humanen Sinus maxillaris mit histologisch gesichertem Pilzball untersucht. Die Ergebnisse der hier verwendeten *Aspergillus*-PCR mit Zielsequenz in der mitochondrialen DNA von *Aspergillus* spp. wurden mit denen einer universellen Pilz-PCR mit Zielsequenz in der fungalen 28S rDNA verglichen. Während mit der *Aspergillus*-PCR in 48 Proben *Aspergillus*-spezifische DNA amplifiziert wurde, gelang das mit der universellen PCR in nur 29 Proben. Weitere Analysen zeigten, dass vermutlich

die Anwesenheit von Sporen apathogener Pilze zu Amplifikaten in der universellen Pilz-PCR führt, so dass die DNA der pathogenen Aspergillen nicht detektiert werden kann. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Sequenzierung der Amplifikate der Aspergillus-PCR eine Identifizierung der Spezies *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, sowie der Erreger endemischer Systemmykosen, *Coccidioides posadasii* und *Histoplasma capsulatum*, ermöglicht. Hingegen wird die DNA von Pilzen der Stämme *Basidiomycota* und *Zygomycota*, der Gattung *Candida* und von *A. glaucus* in dieser PCR nicht amplifiziert.

Alle 81 Proben wurden auch mit der Zygomyzeten-PCR mit Zielsequenz in der 18S ribosomalen DNA untersucht. In nur einer Probe wurde DNA von Zygomyzeten amplifiziert, die anhand der Sequenzierung als *Rhizomucor pusillus*-spezifisch identifiziert wurde. Daraus kann vorsichtig gefolgert werden, dass die Anwesenheit von Zygomyzeten-spezifischer DNA in Atemwegsproben trotz des ubiquitären Vorkommens der Pilze eine Seltenheit ist. Der Nachweis spezifischer DNA muss bei entsprechender Symptomatik als dringender Verdacht auf eine invasive Zygomykose gedeutet werden. In dieser Studie wurde erstmalig nachgewiesen, dass die Zygomyzeten-PCR auch die DNA einiger *Basidiomycota* amplifiziert. Mittels Sequenzierung kann diese von Zygomyzeten-spezifischer DNA differenziert werden, wenngleich eine eindeutige Spezieszuordnung innerhalb der *Basidiomycota* aufgrund großer Homologien nicht möglich ist. Der Nachweis *Basidiomycota*-spezifischer DNA in Sinusproben ist gut vereinbar mit Literaturdaten, die von einer Kolonisation mit *Basidiomycota* bei chronischer Obstruktion durch Pilzbälle ausgehen.

Die Studienergebnisse zeigen, dass der simultane Einsatz der zwei spezifischen PCR-Verfahren zum Nachweis von Schimmelpilz-DNA in humanen Atemwegsproben einer universellen Pilz-PCR überlegen ist. Die damit verbundene Speziesidentifizierung ermöglicht eine frühzeitige, differenzierte und damit effektive antimykotische Therapie.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Apfalter P, Reischl U, Hammerschlag MR.
In-house nucleic acid amplification assay in research: How much quality control is needed before one can rely upon the results?
J Clin Microbiol. 2005; **43**: 5835-5841
- [2] Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ.
Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants : An international consensus.
Clin Infect Dis 2002; **34**: 7-14
- [3] Baddley JW, Pappas P, Smith AC, Moser S.
Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a University Hospital.
J Clin Microbiol 2003; **41**: 5525-5529
- [4] Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A.
Effect of the fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction.
J Histochem Cytochem 1990; **39**: 351-354
- [5] Bialek R, Cirera AC, Herrmann T, Aepinus C, Shearn-Bochsler VI, Legendre AM.
Nested PCR assays for detection of *Blastomyces dermatitidis* DNA in paraffin-embedded canine tissue.
J Clin Microbiol 2003; **41**: 205-208
- [6] Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzalez GM, Just-Nuebling G, Willing B, Presterl E, Lass-Floerl C, Rickerts V.
PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue.
J Clin Pathol. 2005; **58**: 1180-1184
- [7] Blitzer A, Lawson W.
Mycotic infections of the nose and paranasal sinus.
In English G (ed): Otolaryngology. St. Louis, JB Lippincott, 1992, pp 1-23
- [8] Blitzer A, Lawson W.
Fungal infections of the nose and paranasal sinuses. Part I.
Otolaryngol Clin North Am 1993; **26**: 1007-35
- [9] Bodey GP, Vartivarian S.
Aspergillosis.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; **8**: 413-437

- [10] Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M, Fleury-Feith J.
Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR.
J Clin Microbiol. 1995; **33**: 1164-1168
- [11] Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Baldus M, Brauninger S, Hehlmann R.
Clinical evaluation of a polymerase chain reaction assay to detect *Aspergillus* species in bronchoalveolar lavage samples of neutropenic patients.
Br J Haematol. 2002; **116**: 803-811
- [12] Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, Spiess B, Hehlmann R.
Current molecular diagnostic approaches to systemic infections with *Aspergillus* species in patients with haematological malignancies.
Leuk Lymphoma 2004; **45**: 463-468
- [13] Buchheidt D, Hummel M.
Aspergillus polymerase chain reaction (PCR) diagnosis
Med Mycol. 2005 (Suppl 1); **43**: 139-145
- [14] Burik van JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA.
Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens.
J Clin Microbiol. 1998; **36**: 1169-1175
- [15] Buzina W, Braun H, Freudenschuss K, Lackner A, Habermann W, Stammberger H.
Fungal biodiversity – as found in nasal mucus.
Med Mycol. 2003; **41**: 149-161
- [16] Buzina W, Braun H, Freudenschuss K, Lackner A, Schimpl K, Stammberger H:
The basidiomycete *Schizophyllum commune* in paranasal sinuses.
Mycoses. 2003; **46** (Suppl. 1): 23-27
- [17] Caillot D, Bassaris H, McGeer A, Arthur C, Prentice HG, Seifert W, De Beule K.
Intravenous Itraconazole in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies, chronic granulomatous diseases, or AIDS.
Clin Infect Dis 2001; **33**: 83-90
- [18] Chakrabarti A, Sharma SC, Chander J.
Epidemiology and pathogenesis of paranasal sinus mycose.
Otolaryngol Head Neck Surg 1992; **107**: 745-750

- [19] Clark S, Campbell CK, Sandison A, Choa DI.
Schizophyllum commune: an unusual isolate from a patient with allergic fungal sinusitis.
J Infect. 1996; **32**: 147-150
- [20] Corpet F.
Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.
Nucleic Acids Res. 1988; **16**: 10881-10890
- [21] Del Palacio-Hernenez A, Fereres J, Larregia Garraus S, Rodriguez-Noriega A, Sanz Sanz F.
Nosocomial infection by Rhizomucor pusillus in a clinical haematology unit.
J Hosp Infect. 1983; **4**: 45-49
- [22] Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, Haas A, Ruhnke M, Lode H.
Efficacy and safety of Voriconazol in the treatment of acute invasive aspergillosis.
Clin Infect Dis 2002; **34**: 563-571
- [23] DeShazo RD, Chapin K, Swain RE.
Fungal sinusitis.
*N Engl J Med.*1997; **337**: 1633-1634
- [24] DeShazo RD, Swain RE.
Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis.
J Allergy Clin Immunol 1995; **96**: 24
- [25] Einsele H, Hebart H, Roller G, Loffler J, Rothenhofer I, Muller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U.
Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes.
J Clin Microbiol 1997; **35**: 1353-1360
- [26] Einsele H, Quabeck K, Muller KD, Hebart H, Rothenhofer I, Loffler J, Schaefer UW.
Prediction of invasive pulmonary aspergillosis from colonisation of lower respiratory tract before marrow transplantation.
Lancet 1998; **352**: 1443
- [27] Eucker J, Sezer O, Graf B, Possinger K.
Mucormycoses.
Mycoses 2001; **44**: 253-260
- [28] Ferreiro JA, Carlson BA, Cody DT.
Paranasal sinus fungus balls.
Head Neck. 1997; **19**: 481-486

- [29] Fortun J, Martin-Davila P, Alvarez ME, Sanchez-Souza A, Quereda C, Navas E, Barcena R, Vicente E, Candelas A, Honrubia A, Nuno J, Pintado V, Moreno S.
Aspergillus antigenemia sandwich-enzyme immunoassay test as a serodiagnostic method for invasive aspergillosis in liver transplant recipients.
Transplantation 2001; **71**:145-149
- [30] Gallis HA, Drew RH, Pickard WW.
Amphotericin B: 30 years of clinical experience.
Rev Infect Dis 1990; **12**: 308-329
- [31] Girmenia C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G, Melillo L, Buelli M, Pizzarelli G, Venditti M, Martino P.
Invasive infections caused by *Trichosporon cutaneum* in patients with haematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature.
J Clin Microbiol 2005; **43**: 1818-1828
- [32] Glimp RA, Bayer AS.
Pulmonary aspergilloma. Diagnostic and therapeutic considerations.
Arch Intern Med 1983; **143**: 303
- [33] Gómez-López A, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Rodriguez-Tuedela JL.
In vitro susceptibility of clinical isolates of Zygomycota to amphotericin B, flucytosine, itraconazole and voriconazole.
J Antimicrobiol Chemotherapy 2001; **48**: 919-921
- [34] Gonzalez CE, Couriel DR, Walsh TJ.
Disseminated zygomycosis in a neutropenic patient: successful treatment with amphotericin B lipid complex and granulocyte-stimulating factor.
Clin Infect Dis. 1997; **24**: 192-196
- [35] Gourley DS, Whisman BA, Jorgensen NL, Martin ME, Reid MJ.
Allergic Bipolaris sinusitis: clinical and immunopathologic characteristics.
J Allergy Clin Immunol 1990; **85**: 583-591
- [36] Granville L, MD, Chirala M, Cernoch P, Ostrowski M, Truong LD.
Fungal sinusitis : Histologic spectrum and correlation with culture.
Hum Pathol. 2004; **35**: 474-481
- [37] Greenberg RA, Scott LJ, Vaughn HH.
Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments.
Curr Opin Infect Dis 2004; **17**: 517-525

- [38] Hall L, Wohlfel S, Roberts GD.
Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory.
J Clin Microbiol 2004; **42**: 622-626
- [39] Hayden RT, Isotalo P, Parrett T, Wolk D, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV.
In situ hybridization for the differentiation of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Pseudallescheria* species in tissue section.
Diagn Mol Pathol. 2003; **12**: 21-26
- [40] Hayden RT, Qian X, Procop GW, Roberts GD, Lloyd RV.
In situ hybridization for the identification of filamentous fungi in tissue section.
Diagn Mol Pathol. 2002; **11**: 119-126
- [41] Hebart J, Loeffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Bohme A, Martin H, Engel A, Bunje D, Kern WV, Schumacher U, Kanz L, Einsele H.
Early detection of *Aspergillus* Infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening.
J Infect Dis 2000; **181**: 1713-1719
- [42] Husain S, Alexander BD, Munoz P, Avery RK, Jacobs R, Dominguez EA, Tollemar JG, Baumgarten K, Yu CM, Wagener MM.
Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients: emerging importance of non-*Aspergillus* mycelial fungi.
Clin Infect Dis 2003; **37**: 221-229
- [43] Iwen PC, Rupp ME, Langnas AN, Reed EC, Hinrichs SH.
Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature.
Clin Infect Dis. 1998; **26**: 1092-1097
- [44] Kataoka-Nishimura S, Akiyama H, Saku K, Kashiwa M, Mori S, Tanikawa S, Sakamaki H, Onozawa Y.
Invasive Infection due to *Trichosporon cutaneum* in patients with haematologic malignancies.
Cancer 1998; **82**: 484-487
- [45] Kontoyiannis DP, Bodey GP.
Invasive Aspergillosis in 2002: An Update.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; **21**: 161-172
- [46] Lass-Floerl C, Aigner J, Gunsilius E, Petzer A, Nachbaur D, Gastl G, Einsele H, Loeffler J, Dierich MP, Wurznner R.
Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies.
Br J Haematol. 2001; **113**: 180-184

- [47] Lass-Floerl C, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, Freund M, Kropshofer G, Dierich MP, Nachbaur D.
Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience.
Br J Haematol. 2005; **131(2)**: 201-207
- [48] Lass-Floerl C, Gunsilius E, Gastl G, Freund M, Dierich M, Petzer A.
Clinical evaluation of Aspergillus-PCR for detection of invasive aspergillosis in immunosuppressed patients.
Mycoses 2005; **48**: 12-17
- [49] Latge JP.
Aspergillus fumigatus and aspergillosis.
Clin Microbiol Rev 1999; **12**: 310-350
- [50] Lee FY, Mossad SB, Adal KA
Pulmonary mucormycosis: the last 30 years.
Arch Intern Med 1999; **159**: 1301
- [51] Li L, Que T, Lin Y, Gong Y.
Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed human tissues.
Fa Yi Xue Za Zhi 1998; **14**: 87-88
- [52] Loeffler J, Hebart H, Bialek R, Hagemeyer L, Schmidt D, Serey FP, Martmann M, Eucker J, Einsele H.
Contaminations occurring in fungal PCR assays.
J Clin Microbiol. 1999; **37**: 1200-1202
- [53] Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, Najvar L, Graybill JR, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Dietz K, Bialek R, Einsele H.
Polymerase chain reaction detection of aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis.
J Infect Dis 2002; **185**: 1203-1206
- [54] Mackenzie JJ.
Preliminary report on Aspergillus mycosis of the antrum maxillare.
Johns Hopkins Hospital Bulletin 1893; **4**: 9-10
- [55] McNulty JS.
Rhinocerebral mucormycosis: Predisposing factors.
Laryngoscope 1982; **92**: 1140
- [56] Millar JW, Johnston A, Lamb D.
Allergic aspergillosis of the maxillary sinuses [Abstract].
Thorax 1981; **36**: 710.

- [57] Milosev B, el-Margoub S, Aal OA, el-Hassan AM.
Primary aspergilloma of the paranasal sinus in the Sudan – a review of seventeen cases.
Br J Surg 1969; **56**: 132-137
- [58] Mora-Duarte, J, Betts R, Rotsten C.
A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin for the treatment of candidal esophagitis.
N Engl J Med 2002; **347**: 2020-2029
- [59] Morpeth JF, Rupp NT, Dolen WK, Bent JP; Kuhn FA.
Fungal sinusitis : an update.
Ann Allergy Asthma Immunol 1996; **76**: 128-40
- [60] Moses JS.
Ocular rhinosporidiosis in Tamil Nadu, India.
Mycopathologia 1990; **111**: 5-8
- [61] Oakley KL, Moore CB, Denning DW.
In vitro activity of SCH-56592 and comparison with activities of amphotericin B and itraconazol against *Aspergillus* species.
Antimicrob Agents Chemother. 1997; **41**: 1124- 1126
- [62] O'Connell MA, Pluss JL, Schkade P
Rhizopus-induced hypersensitivity pneumonitis in atractor driver.
*J Allergy Clin Immunol.*1995; **95**: 779-781
- [63] Ohara Y, Honma M, Iwasaki Y.
Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting human T-cell leukemia virus type I sequences in paraffin-embedded tissue. Effect of unbuffered formalin fixation.
J Virol Methods. 1992; **37**(1): 83-88
- [64] Pagano L, Offidani M, Fianchi L, Nossari A, Candoni A, Piccardi M, Corvetta L, D'Antonio D, Del Bavero A.
Mucormycosis in hematologic patients.
Haematologica 2004; **89**: 207-214
- [65] Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA, Roberts GD.
The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis.
Mayo Clinic Proc. 1999; **74**: 877-884
- [66] Prabhu RM, Patel R.
Mucormycosis and entomophthoromycosis: a review of clinical manifestations, diagnosis and treatment.
Clin Microbiol Infect 2004; **10**: 31-47

- [67] Radner AB, Witt MD Edwards JE Jr.
Acute invasive rhinocerebral zygomycosis in an otherwise healthy patient: Case report and review.
Clin Infect Dis 1995; **20**: 163
- [68] Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ.
Zygomycetes in human disease.
Clin Microbiol Rev 2000 :236-301
- [69] Richardson MD, Warnock DW.
Fungal Infection – Diagnosis and Management.
Blackwell Publishing 2003, 3.edition
- [70] Rickerts V, Loeffler J, Boehme A, Einsele H, Just-Nubling G.
Diagnosis of disseminated zygomycosis using a polymerase chain reaction assay.
Eur J Microbiol Infect Dis 2001; **20**: 744-745
- [71] Riede UN.
Entzündungspathologie.
In: Riede UN (eds), *Taschenatlas der allgemeinen Pathologie*, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 193-229
- [72] Rogers BB, Alpert LC, Hine EAS, Buffone GJ.
Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction.
Am J Pathol. 1990; **136**: 541
- [73] Rubin RH, Young LS, Russell S (ed.).
Clinical approach to infection in the compromised host.
Kluwer Academic/Plenum Publishers 2002, 4. edition
- [74] Ruhnke M.
Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten.
Uni-Med-Verlag 2003, 3. Auflage
- [75] Salonen J, Lehtonen OP, Terasjarvi MR, Nikoskeleinen J.
Aspergillus antigen in serum, urine and bronchoalveolar lavage specimens of neutropenic patients in relation to clinical outcome.
Scand J Infect Dis. 2000 ; **32**: 485-490
- [76] Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD.
Molecular probes used for diagnosis of fungal infections.
J Clin Microbiol 1995; **33**: 2913-2919

- [77] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Nat Acad Sci USA 1977; **74**: 5463-5467
- [78] Sarti EJ, Lucente FE.
Aspergillosis of the paranasal sinuses.
Ear Nose Throat J 1988; **67**: 824-31
- [79] Scharf JL, Soliman AM.
Chronic rhizopus invasive fungal rhinosinusitis in an immunocompetent host.
Laryngoscope 2004; **114**: 1533-1535
- [80] Schubert MS.
Medical treatment of allergic fungal sinusitis.
Ann Allergy Asthma Immunol 2000; **85**: 90-101
- [81] Schubert MS.
Fungal Rhinosinusitis: Diagnosis and therapy.
Curr Allergy Asthma Rep. 2001; **1**(3): 268-276
- [82] Schwartz S, Theil E.
Clinical presentation of invasive aspergillosis.
Mycoses 1997; **40**(suppl 2): 21
- [83] Severo LC, Job F, Mattos TC.
Systemic zygomycosis: Nosocomial infection by *Rhizomucor pusillus*.
Mycopathologica 1991; **113**: 79-80
- [84] Spiess B, Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Seifarth W, Zeilfelder U, Leib-Mosch C, Morz H, Hehlmann R.
Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients.
J Clin Microbiol. 2003; **41**: 1811-1818
- [85] Stammberger H.
Endoscopic surgery for mycotic and chronic recurring sinusitis.
Ann Otol Rhinol Laryngol 1985; **94** (suppl 119): 1-11
- [86] Stammberger H, Jaske R, Beaufort F.
Aspergillosis of the paranasal sinuses.
Ann Otol Rhinol Laryngol 1984; **93**: 251-256
- [87] Steinbach W, Perfect J, Schell W, Walsh T, Benjamin D.
In vitro analyses, animal models, and 60 clinical isolates of invasive *Aspergillus terreus* infection.
Antimicrob Agents Chemother. 2004; **48**: 3217-3225

- [88] St. Germain G, Robert A, Ishak M, Tremblay C, Claveau S.
Infection due to *Rhizomucor pusillus*: report of four patients in cases with leukaemia and review.
Clin Infect Dis. 1993; **16**: 640-645
- [89] Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, Fothergill AW, Rinaldi MG.
In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazol.
J Clin Microbiol. 1999; **37**: 2343-2345
- [90] Talbot GH, Huang A, Provencher M.
Invasive *Aspergillus* rhinosinusitis in patients with acute leukemia.
Rev Infect Dis 1991; **13**: 219-232
- [91] Tarrand JJ, Lichterfeld M, Warraich I, Luna M, Han XY, May GS, Kontoyiannis DP.
Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination.
Am J Clin Pathol 2003; **119**: 854-858
- [92] Tedder M, Spratt JA, Anstadt MP, Hedge SS, Tedder S, Lowe JE.
Pulmonary mucormycosis: Results of medical and surgical therapy.
Ann Thorac Surg 1994; **57**:1044
- [93] Vennewald I, Henker M, Klemm E, Seebacher C.
Fungal colonization of the paranasal sinuses.
Mycoses 1999; **42**: 33-36
- [94] Veress B, Malik OA, Tayeb A, el-Daoud S, Mahgoub E, Hassan A.
Further observations on the primary paranasal *Aspergillus* granuloma in the Sudan.
Am J Trop Med Hyg 1973; **22**: 765-72
- [95] Verma A, Williams S, Trifilio S, Zembower T, Mehta J.
Successful treatment of concomitant pulmonary zygomycosis and aspergillosis with a combination of amphotericin B lipid complex, caspofungin and voriconazole in a patient on immunosuppression for chronic graft-versus-host disease.
Bone Marrow Transplant. 2004; **33**: 1065-1066
- [96] Voigt K, Cigelnik E, O'Donnell K.
Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data.
J Clin Microbiol. 1999; **37**: 3957-3964
- [97] Waitzman AA, Birt BD.
Fungal sinusitis.
J Otolaryngol 1994; **23**: 244

- [98] Walsh TJ.
Trichosporonosis.
Infect Dis Clin N Am. 1989; **3**: 43-52
- [99] Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, Chanock SJ.
PCR and single-stranded conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi.
J Clin Microbiol 1995; **33**: 3216-3220
- [100] Walsh TJ, Petraitis V, Petraitienne R, Field-Ridley A, Sutton D, Ghannoum M, Sein T, Schaufele R, Peter J, Bacher J, Casler H, Armstrong D, Espinel-Ingroff A, Rinaldi MG, Lyman CA.
Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B.
J Infect Dis. 2003; **188**: 305-319
- [101] Weitzman I, Whittier S, McKittrick JC, Della-Latta P.
Zygosporangia: the last word in identification of rare or atypical zygomycetes isolated from clinical specimens.
J Clin Microbiol. 1995; **33**: 781-783
- [102] Wen PC, Rupp ME, Langnas AN.
Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature.
Clin Infect Dis 1998; **26**: 1092-1097
- [103] Williams C, Pontén F, Moberg C, Soederkvist P, Uhlén M, Pontén J, Sitbon G, Lundberg J.
A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens.
Am J Pathol. 1999; **5**: 1467-1471
- [104] Williamson EC, Millar MR, Steward CG.
Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation.
Br J Haematol 1999; **104**: 560-568
- [105] Willinger B, Obradovic A, Selitsch B, Beck-Mannagetta J, Buzina W, Braun H, Apfalter P, Hirschl AM, Makristathis A, Rotter M.
Detection and identification of fungi from fungus balls of the maxillary sinus by molecular techniques.
J Clin Microbiol 2003; **41**: 581-585
- [106] Yamakami Y, Hashimoto A, Yamagata E.
Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis.
J Clin Microbiol 1998; **36**: 3619- 3623

- [107] Yohai RA, BullockJD, Aziz AA, Markert RJ.
Survival factors in rhino-orbital-cerebral mucormycosis.
Surv Ophthalmol. 1994; **39**: 3-22
- [108] Zinnreich SJ, Kennedy DW, Malat J.
Fungal sinusitis: Diagnosis with CT and MRI imaging.
Radiology 1988; **169**: 439-444
- [109] Zsikla V, Baumann M, Cathomas G.
Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax
embedded small biopsies using real-time PCR.
J Clin Pathol. 2004; **57**: 654-656

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

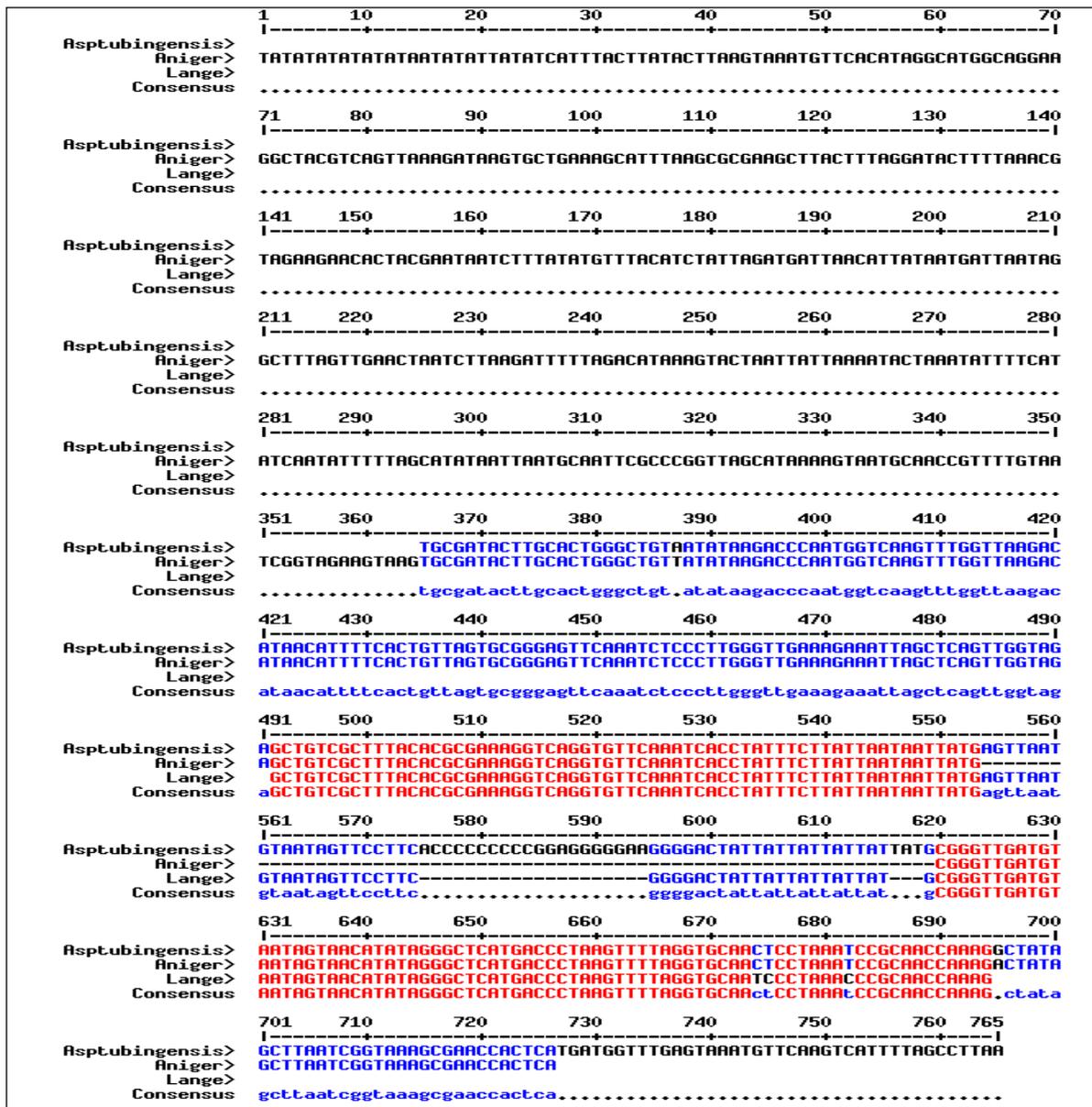
A	Adenin
A.	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-Triphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C.	<i>Candida</i>
°C	Grad Celsius
CFU	Colony forming units, Kolonie bildende Einheiten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
et al.	et alii, und andere
EtBr	Ethidiumbromid
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
KCl	Kaliumchlorid
LP	Laborprobe
M	Mol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

ml	Milliliter
min	Minute
mM	Millimol
NCBI	National Center of Biotechnology Information
Nr.	Nummer
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reagenz
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Pikomol
rpm	Round per minute, Umdrehungen pro Minute
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
sek	Sekunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Taq	Thermus aquaticus
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
Vol	Volumenteile, Volumen

n	Tübingen	Wien				
			n	Universelle Pilz-PCR (Wien)	Aspergillus PCR	Zygomyceten PCR
26	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	15	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	negativ
			10	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	Basidiomyzet
			1	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i>
2	<i>A. fumigatus</i>	negativ	2	negativ	<i>A. fumigatus</i>	negativ
19	<i>A. fumigatus</i>	andere	3	<i>Itersonilia perplexans</i>	<i>A. fumigatus</i>	negativ
			2	zwei Sequenzen	<i>A. fumigatus</i>	Basidiomyzet
			2	nicht identifiziert	<i>A. fumigatus</i>	Basidiomyzet
			2	zu viele N	<i>A. fumigatus</i>	Basidiomyzet
			2	nicht identifiziert	<i>A. fumigatus</i>	negativ
			2	zu viele N	<i>A. fumigatus</i>	negativ
			1	<i>Strobilurus trullisatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	Basidiomyzet
			1	<i>Blumeria graminis</i>	<i>A. fumigatus</i>	Basidiomyzet
			1	zwei Sequenzen	<i>A. fumigatus</i>	negativ
			1	<i>C. pseudointermedia</i>	<i>A. fumigatus</i>	negativ
			1	<i>C. tropicalis</i>	<i>A. fumigatus</i>	negativ
1	<i>Malassezia globosa</i>	<i>A. fumigatus</i>	negativ			
1	<i>A. flavus</i>	nicht ident.	1	nicht identifiziert	<i>A. flavus</i>	negativ
1	negativ	<i>A. fumigatus</i>	1	<i>A. fumigatus</i>	negativ	negativ
15	negativ	negativ	13	negativ	negativ	negativ
			2	negativ	negativ	Basidiomyzet
17	negativ	andere	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	negativ	Basidiomyzet
			2	<i>Malassezia restricta</i>	negativ	Basidiomyzet
			1	zwei Sequenzen	negativ	Basidiomyzet
			1	<i>A. versicolor</i>	negativ	Basidiomyzet
			1	<i>Blumeria graminis</i>	negativ	Basidiomyzet

			1	<i>Itersonilia perplexans</i>	negativ	Basidiomyzet
			1	zu viele N	negativ	<i>Basidiomyzet</i>
			1	zwei Sequenzen	negativ	negativ
			1	<i>A. versicolor</i>	negativ	negativ
			1	<i>Penicillium expansum</i>	negativ	negativ
			1	<i>Phialemonum dimorphosum</i>	negativ	negativ
			1	zu viele N	negativ	negativ
			1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	negativ	<i>Trichosporum cutaneum</i>

Tabelle 19: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der 81 Sinus-Proben mittels Aspergillus- und Zygomyzeten-PCR (in Tübingen) sowie universeller Pilz-PCR (in Wien). n = Anzahl; nicht ident. = Sequenz nicht identifizierbar; zu viele N = Sequenz nicht lesbar aufgrund zu vieler nicht lesbarer Nukleotide.



Primer: AM 1: 672/5'- CTT TGG TTG CGG GTT TAG GGA TT -3'/694
 AM 2: 443/5'- GGG AGT TCA AAT CTC CCT TGG G -3'/464
 AM 3: 509/5'- GAA AGG TCA GGT GTT CGA GTC AC -3'/531

Abbildung 13: Sequenzausschnitt eines Teilbereichs der mitochondrialen DNA von *A. tubingensis*, *A. niger* und dem im Rahmen dieser Studie sequenzierten *A. niger* (hier: Lange); Darstellung der Primer im Detail.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas bedanke ich mich bei PD Dr. Ralf Bialek. Ebenso für seine umfassende und hilfsbereite Betreuung im Verlauf der Arbeit sowie für die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts.

Den Mitarbeitern der AG Zelck/Bialek, insbesondere Walter Deschle und Oliver Schneider, danke ich für die kompetente Einarbeitung in die Methoden und die hilfreichen Tipps im Umgang mit den Materialien.

Frau Prof. Dr. Willinger danke ich für die freundliche Überlassung der Paraffinschnitte und die mehrmalige Übersendung verschiedener Aspergillus-Stämme sowie weiterer Proben.

Daniel danke ich für seine unermüdliche Hilfe und seine Geduld, meiner Familie und meinen Freunden für die anhaltende Motivation und Unterstützung.

LEBENS LAUF

■ **Persönliche Daten**

Name: Simone Isabelle Lange
Geburtsdatum und -ort: 27. Mai 1979 in Stuttgart
Familienstand: ledig

■ **Schulbildung**

1985 – 1989 Pestalozzi-Grundschule in Gerlingen
1989 – 1998 Gymnasium Gerlingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

■ **Studium**

1998 – 1999 Studium der Psychologie, Universität Mannheim

seit 10/2000 Studium der Humanmedizin, Universität Tübingen
09/2002 Physikum
08/2003 Erstes Staatsexamen
09/2005 Zweites Staatsexamen
11/2006 Drittes Staatsexamen und Approbation

■ **Famulaturen**

03/2003 Innere Medizin, Diakonissen-Krankenhaus Stuttgart
04/2004 Chirurgie, Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
08/2004 Anästhesie und Intensivmedizin, Klinikum Ludwigsburg
09/2004 Neurologie, Christophsbad Göppingen
10/2004 Accident & Emergency Unit, Royal Lancaster Infirmary, England

■ **Praktisches Jahr**

im Städtischen Krankenhaus Sindelfingen
10/05 – 02/06 Innere Medizin
02/06 – 06/06 Anästhesie und Intensivmedizin
06/06 – dato Allgemein-, Gefäß- und Unfallchirurgie