

Christina Fauser

Dr. med.

Design und Charakterisierung von Primern und Sonden auf dem 18S rRNA-Gen zur molekularen Diagnostik von Mykosen

Geboren am 12. 11. 1971 in Ulm

Reifeprüfung am 11. 06. 1991

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991 bis SS 1998

Physikum am 30. 08. 1993 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg/ Houston, Texas

Staatsexamen am 15. 06. 1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene

Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. med. R. Kappe

Invasive Mykosen sind lebensbedrohliche Erkrankungen vor allem schwerkranker, immungeschwächter Patienten. Nur frühzeitige Diagnostik und gezielte antimykotische Therapie ermöglichen das Überleben der Patienten. Testsysteme sollten sensitiv und spezifisch für Pilzinfektionen sein, häufige Erreger differenzieren und innerhalb eines Arbeitstages durchführbar sein. Die mikroskopische Untersuchung von Patientenmaterial, die kulturelle Anzucht der Pilze und serologische Verfahren zum Pilz-Antikörper- und -Antigen-Nachweis erfüllen diese Anforderungen nur teilweise. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten molekularbiologischen Verfahren zur Pilz-Identifizierung sind innerhalb eines kurzen Zeitraums durchzuführen, nicht auf lebende Pilzzellen angewiesen und bei geeigneter Oligonukleotid-Wahl sensitiv und spezifisch.

Um unter einer großen Zahl opportunistischer Erreger selektiv die sehr uneinheitliche Gruppe der mykotischen Erreger abzugrenzen, wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion mit breitreaktiven, pilzspezifischen Primern durchgeführt. Vier in der Arbeit näher charakterisierte Primerpaare erwiesen sich als geeignet, da durch sie von 67 Pilzspecies und 11 Kontrollen weitgehend alle medizinisch relevanten Pilze amplifiziert wurden, jedoch keine Kreuzreaktionen mit DNA aus Mensch, Bakterie oder Parasit auftraten.

Zur Bestätigung der Pilzinfektion und zur Zuordnung des Pilzes zu einer der Hauptgruppen Hefen, Schimmel, Dermatophyten und dimorphe Pilze wurden die PCR-Amplifikate mit

Pilzgruppen-spezifischen Oligonukleotiden hybridisiert. Die verwendeten vier Oligonukleotide entsprachen den Anforderungen an gruppenspezifische Sonden, da sie jeweils mit allen wichtigen Vertretern der einzelnen Pilzgruppen hybridisierten, nicht jedoch mit Pilzen aus den jeweils anderen Pilzgruppen.

Der Sensitivitätsvergleich molekularer und konventioneller Verfahren anhand einer Verdünnungsreihe mit *Candida*-Sproßzellen ergab, daß der Nachweis von *Candida*-Zellen mittels PCR und Mikroskopie um zwei Zehnerpotenzen, der Nachweis mittels Antigen-Test um drei Zehnerpotenzen unempfindlicher als der kulturelle Nachweis ist. Die Kultur wies eine einzige lebende Zelle nach. Mit dem empfindlichsten Primerpaar lag die Nachweisgrenze präparierter *Candida*-DNA bei 250 fg. Der Nachweis von Pilzzellen in klinischem Material zeigte sich gegenüber dem Nachweis von Pilzzellen in reinem Wasser oder Kochsalz als erschwert:

PCR-Amplifikation von DNA aus Pilz-Reinkulturen ist ohne Vorbehandlung möglich; der Anteil an Zellen, die spontan platzen und DNA freigeben, ist jedoch insgesamt gesehen gering (<1%) und reicht bei wenigen Pilzen und bei Anwesenheit von Inhibitoren nicht immer für die PCR aus. Durch Protoplastierung der Pilze wird der Anteil lysierter Zellen auf über 90 % erhöht.

Klinisches Material, Enzypuffer und Zellbestandteile der Pilzzelle selbst enthalten Inhibitoren. Bei der Inhibitoren-Abtrennung geht DNA verloren, was zu einem ca. 10-fachen Sensitivitätsverlust gegenüber einer inhibitoryfreien unbehandelten *Candida*-Suspension führt.

Die für die Einbettung von Gewebeschnitten in Paraffin nötige Formalinfixierung führt zu Vernetzungen zwischen DNA und Proteinen, die einen Amplifikations-Abbruch bei der anschließenden PCR zur Folge haben, der um so mehr ins Gewicht fällt, je größer das Amplifikationsprodukt ist. Mit Primerpaaren, deren Amplifikat kleiner 200 Basenpaare ist, wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit erfolgreich DNA aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Pilzmyzelien amplifiziert.

Für die Labor-Diagnostik bleiben - trotz einer Reihe von Vorteilen der PCR - Kultur und Mikroskopie weiterhin die Goldstandard-Methoden.

Immunologische und molekularbiologische Verfahren sind der konventionellen Labordiagnostik in einzelnen Teilbereichen überlegen (z.B. bei Untersuchung von abgestorbenem Pilzmaterial in Paraffinblöcken oder von Patientenproben, die wenig lebende Pilzzellen enthalten). Für die Anwendung molekularer Methoden in der Routine-Diagnostik, in Form einfach zu handhabender Kits, müssen jedoch die bis jetzt sehr aufwendigen DNA-Präparations- und Inhibitoren-Abtrennungs-Verfahren, die bei der Aufarbeitung von klinischem Material für die PCR meist unvermeidbar sind, noch weiter vereinfacht werden.