

Nardine Menassa

Dr. med.

PCR Schnelldiagnostik von Pilzkeratitiden mittels des DNA-stabilisierenden Flinders Technology Associates[®] Filterpapiers

Geboren am 19.12.1983 in Alexandria / Ägypten

Staatsexamen am 12.05.2009 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Augenheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Gerd U. Auffarth

Ziel: Die Polymerasekettenreaktion (PCR) nimmt zunehmend an Bedeutung für die Diagnostik von Pilzkeratitiden. Die Methode der Probeentnahme und die DNA-Extraktion vor der PCR können die Test-Sensitivität beeinflussen. Das Ziel der Studie war die Prüfung des DNA-stabilisierenden Flinders Technology Associates[®] (FTA[®]) Filterpapiers zur Probeentnahme bei Pilzkeratitiden ohne DNA-Extraktion für eine direkte PCR.

Methoden: Impressionsproben wurden von der Augenvorderfläche mit dem FTA[®] Filterpapier entnommen. 2mmØ grosse Stanzpräparate des Filterpapiers wurden als Probe direkt in das PCR Reaktionsgefäß zum Nachweis mykotischer DNA mittels direkter PCR gegeben. Die Testsensitivität wurde mittels Verdünnungsreihen von *Candida albicans*-, *Fusarium oxysporum*- und *Aspergillus fumigatus*-Kulturen bestimmt. Die Testspezifität wurde ausgewertet durch Impressionsproben von 196 gesunden Probanden aus der Schweiz und 155 aus Ägypten sowie 19 diagnostizierten Fällen von mikrobiellen Keratitiden.

Ergebnisse: Die Nachweisgrenze der PCR aus dem Filterpapier lag bei 3 Keimen *Candida albicans*, 25 Keimen *Fusarium oxysporum* und 125 Keimen *Aspergillus fumigatus*. Die Pilz-PCR war bei 1% der gesunden Probanden aus der Schweiz und 8,4% der klinisch gesunden ägyptischen Probanden positiv. Bei den Keratitis-Fällen blieb die Pilz-PCR korrekt negativ in 14 Fällen mit bakteriellem Wachstum. Die PCR ergab ein positives Resultat in 4 mykotisch-bedingten Fällen, blieb jedoch negativ in einem Fall einer *Aspergillus fumigatus* Keratitis.

Schlussfolgerungen: Die Impressionsprobe mit dem Indicating FTA[®] Filterpapier stellt eine einfache, schnelle und günstige Methode dar zur Probeentnahme aus der Augenvorderfläche. Es erlaubt einen hohen DNA-Gewinn, ohne dass eine folgende DNA-Extraktion benötigt wird. Die Kombination des FTA[®] Filterpapiers mit einer direkten PCR stellt eine elegante Methode zur Diagnostik von Pilzkeratitiden dar. Die analytische Sensitivität ist hoch und

vergleichbar mit vorbeschriebenen nested PCR Protokollen. Die klinische Spezifität liegt im Bereich von 91.7-99.0%. Die direkte Applikation des FTA[®] Filterpapiers in die PCR-Reaktion in einem ITS-basierten PCR Protokoll hat eine hohe Sensitivität zum Nachweis von *Candida*-, *Fusarium*- und *Paecilomyces*-Gattungen. Es zeigt jedoch Einschränkungen, um *Aspergillus*-Gattungen nachzuweisen.