

Ina Bujard
Dr. med.

Evaluation von Primern und Sonden auf dem 18S rRNA Gen zur molekularen Diagnostik invasiver Aspergillosen

Geboren am 7. 10. 1974 in Dinkelsbühl
Staatsexamen am 25. 10. 2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. med. R. Kappe

Invasive Mykosen sind systemische Pilz-Infektionen, die in erster Linie immunkompromittierte Patienten betreffen. Für den Erfolg der antimykotischen Therapie und damit die Prognose der Patienten ist eine schnelle und sichere Diagnostik unerlässlich. Eine ideale Nachweismethode sollte folgende Bedingungen erfüllen: Sie sollte schnell durchführbar sein, über eine hohe Sensitivität verfügen und spezifisch Pilze beziehungsweise einzelne Pilz-Untergruppen nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Assay evaluiert, der mit Hilfe von Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und anschließender Hybridisierung (DNA-Enzym-Immuno-Assay) genau dies erreichen sollte. Es wurde ein universelles Primersystem entwickelt, mit dessen Hilfe die DNA einer breiten Palette verschiedener Pilz-Arten amplifiziert wurde. Für die anschließende Hybridisierung wurden acht spezifische Sonden entwickelt, um amplifizierte Pilz-DNA taxonomisch einzelnen Pilzgruppen zuordnen zu können. Die Spezifität des Assays wurde an 64 Pilz-Arten und 13 Kontrollen ermittelt. Die Sensitivität wurde anhand von *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* DNA- und Zellverdünnungsreihen ermittelt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Assay auf seine Eignung für die klinische Diagnostik hin beurteilt, indem 308 Proben von 175 Patienten damit untersucht wurden. Durch Vergleich mit den herkömmlichen Methoden der mykologischen Diagnostik – Kultur, Mikroskopie und Serologie – wurden seine diagnostische Sensitivität und Spezifität für die invasive Aspergillose ermittelt.

Das universelle Pilz-Primersystem erfasste 58 der 64 medizinisch relevanten Pilze, darunter 19 der 21 untersuchten Hefen, 21 von 27 Schimmelpilzen, 12 von 12 Dermatophyten, die drei dimorphen Pilze *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* und *Paracoccidioides brasiliensis* sowie *Pneumocystis jiroveci* und darüber hinaus auch Steinpilz und Champignon. Für *Candida krusei* musste ein separater Rückwärtsprimer, RCK1, entwickelt werden. Fünf spezifische Sonden erlaubten die sichere taxonomische Einordnung der Hefe-Arten *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* und *Cryptococcus neoformans* sowie von *Pneumocystis jiroveci*. Eine Sonde für die Schimmelpilz-Gattung *Aspergillus* kreuzreagierte unter anderem mit der Gattung *Penicillium*. Kreuzreaktionen mit bakterieller, parasitärer oder Säugetier-DNA traten nicht auf. Der Assay erfasste sicher 1 pg *C. albicans* und 1 pg *A. fumigatus* DNA. In Kochsalz-Suspensionen waren *C.-albicans*-Blastosporen und *A.-fumigatus*-Konidiosporen ab einer Menge von 100 Zellen nachweisbar. Damit war der Assay empfindlicher als Mikroskopie und Antigen-Nachweis, jedoch weniger empfindlich als die Kultur. Als erste Kontrollgruppe des klinischen Aspergillose-Teils der Arbeit wurden intraoperativ gewonnene Bronchialsekrete von 50 lungengesunden, abdominalchirurgischen Patienten untersucht: 50 von 50 waren mikroskopisch negativ, 48

von 50 waren kulturell negativ, in zwei Fällen wuchs vereinzelt *C. albicans* (Kontamination der Mund- und Rachenflora), 50 von 50 waren im PCR-Assay negativ. Als zweite Kontrollgruppe wurden 170 Proben von 102 Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen untersucht, bei denen eine invasive Aspergillose ausgeschlossen worden war: Bei keinem von ihnen zeigte sich in der Mikroskopie ein Hinweis auf Schimmelpilze, 10 von 102 Patienten waren kulturell positiv für Schimmelpilze (davon 8 für *Aspergillus* spp. und 2 für *Penicillium* spp.), 11 von 102 Patienten waren mit dem PCR-Assay und der *Aspergillus*-Sonde positiv in mindestens einer Probe. Fünf Patienten waren sowohl kulturell als auch in der PCR-positiv. Die Gruppe der Patienten mit invasiver Aspergillose umfasste 23 Patienten: Bei 6 von 21 wurden mikroskopisch Schimmelpilze nachgewiesen, 20 von 23 waren kulturell positiv (19 *Aspergillus* spp., 1 *Penicillium* spp.), ebenfalls 20 von 20 waren im PCR-Assay positiv. Die Kombination aller drei Methoden erfasste 22 von 23 Fällen.

Der hier evaluierte universelle Pilz-PCR-Assay war in der Lage, schnell und sicher 58 klinische relevante Pilze, mit Ausnahme von *Candida krusei* und einigen Zygomyceten, in Reinkulturen sowie aus klinischen pulmonalen Materialien nachzuweisen und *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans*, *P. jiroveci* und *Aspergillus* spp. taxonomisch einzuordnen. Für invasive Aspergillosen erreichte er eine Sensitivität von 86,3%. Die Spezifität betrug 89,7% (Kontrollgruppe andere Lungenerkrankungen) beziehungsweise 93,2% (Kontrollgruppe andere Lungenerkrankungen und lungengesunde Patienten). In Kombination mit den konventionellen Methoden Mikroskopie, Kultur und Antigen-Nachweis kann der PCR-Assay zu einer Verbesserung der bisherigen Diagnostik führen und diese sinnvoll ergänzen.