

Anja Trost

Dr. med.

## **Molekulare Diagnostik systemischer Mykosen- Methoden zur schnellen Erregerdetektion und Speziesidentifizierung**

Geboren am 29.04.1977 in Heidelberg

Staatsexamen am 23.06.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. A. D. Ho

Die Inzidenz systemischer Mykosen hat in den letzten Jahren zugenommen. Vor allem bei immunsupprimierten Patienten mit z.B. hämatologischen Erkrankungen und AIDS sind sie häufige Krankheits- und auch Todesursache.

Es ist dabei sowohl bei den Sproß- wie auch bei den Fadenpilzen zu Verschiebungen im Erregerspektrum gekommen. Bei den Sproßpilzen hat *Candida dubliniensis*, welcher mit HIV-Infektionen und AIDS assoziiert ist, jedoch auch bei HIV-negativen Patienten isoliert wurde, eine zunehmende Bedeutung gewonnen. Zudem wurden Resistenzen einzelner Spezies gegen Antimykotika beschrieben.

Systemische Mykosen sind rapide verlaufende und oft letal endende Krankheiten. Eine rasche Diagnostik und akkurate Erregeridentifikation auf Speziesebene ist für eine rechtzeitige und resistenzgerechte Therapie unerlässlich. Die molekulare Diagnostik, bei der die Amplifikation von DNA die Grundlage darstellt, bietet hierfür eine Reihe von Möglichkeiten. Rasche, einfach anwendbare und kostengünstige Methoden sind für den breiten Einsatz in Routinelaboratorien wichtige Voraussetzungen.

Einsele et al. (1997) entwickelten eine Methode zur Speziesidentifikation von Sproß- und Fadenpilzen mittels spezies-spezifischer Hybridisierungssonden. Das zugrunde liegende PCR-Produkt stellte ein Amplifikat der 18S rDNA dar. Dieses Protokoll sollte in unserem Routinelabor etabliert werden. Bei dem Versuch der Reproduktion der DNA-Amplifikation und einer spezifischen Hybridisierung zunächst nur mit der für *Candida albicans* spezifischen Sonde konnte keine ausreichende Sensitivität der Hybridisierungsreaktion erreicht werden. Sequenzanalysen mithilfe von EMBL/Genbank zeigten, daß die Sonde aufgrund ihrer

Sekundärstruktur zu einer Schlingenbildung prädisponierte. Dies wurde als mögliche Ursache der mangelnden Sensitivität angenommen. Auch die Sequenzen der übrigen Sonden wurden untersucht. Aufgrund hoher Sequenzübereinstimmungen mit nah verwandten Spezies beachteten wir sie zum Teil als ungeeignet für eine spezifische Hybridisierungsreaktion. Die 18S rDNA weist bei den Sproß- und vor allem bei den Fadenpilzen wenige Sequenzdifferenzen zwischen den Spezies auf, weshalb sie sich für molekularbiologische Methoden zur Speziesdifferenzierung der häufigen humanpathogenen Spezies schlecht eignet. Wir verließen somit dieses Protokoll und entschieden uns für die Erstellung eines molekularbiologischen Differenzierungsprotokolls im Bereich der hochvariablen ITS-Regionen.

Nach ausgiebigen Sequenzanalysen wurden PCR-Primer für ein PCR-Produkt synthetisiert, welches die ITS-Regionen ITS 1 und ITS 2 beinhaltet (PCR1). Sie wurden für die Vervielfältigung der DNAs der wichtigsten humanpathogenen Sproß- und Fadenpilze erstellt. Das PCR-Produkt war besonders für die Analyse mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) geeignet. Diese Methode ist einfach und schnell durchführbar und bedarf lediglich einer Standardausrüstung der Laboratorien.

Für die klinisch relevanten Sproßpilze wurde eine Differenzierung auf Speziesebene durch das Restriktionsenzym MwoI ermöglicht. Dieses konnte in einem einzigen Reaktionsschritt 12 wichtige humanpathogene Sproßpilze eindeutig anhand ihrer spezifischen Restriktionsfragmentmuster identifizieren. Darunter waren *Candida albicans* und *Candida dubliniensis*, welche zweifelsfrei unterschieden werden konnten. Durch einen zweiten Restriktionsschritt mit dem Restriktionsenzym BslI konnten alle 16 Spezies des Panels eindeutig charakterisiert werden.

*Candida albicans* ist der häufigste humanpathogene Sproßpilz. *Candia dubliniensis* ist mit diesem sehr nah verwandt. Eine schnelle Identifizierung dieser beiden Spezies zur Diagnosestellung kann sinnvoll sein. Zum direkten Nachweis der beiden Spezies wurde ein spezifisches Hybridisierungsoligonukleotid mit einer Zielsequenz im Bereich der PCR 1-Sequenz entwickelt. Eine weitere Speziesdifferenzierung konnte wenn nötig wiederum mit einem einzigen Restriktionsschritt erfolgen.

Bei der Entwicklung der beschriebenen diagnostischen Methoden für Sproßpilze wurde stets darauf geachtet, daß die Methoden auch für die Diagnostik von Fadenpilzen geeignet waren, auch wenn dies nicht Schwerpunkt der Arbeit war. So ermöglicht die RFLP-Analyse des PCR-Produktes der PCR 1 theoretisch eine Speziesidentifizierung von Fadenpilzen. Die Durchführung der PCR 1 war jedoch problematisch, wahrscheinlich aufgrund der bekannten

Schwierigkeiten bei der Aufreinigung von Fadenpilz-DNA. Deshalb entwickelten wir die PCR 2 für ein gemeinsames Differenzierungsprotokoll für Sproß- und Fadenpilze. Die PCR 2 umspannt lediglich die ITS 1-Region, die besonders geeignet für die Differenzierung der Fadenpilzspezies ist. Die Amplifikation dieses kürzeren PCR-Produktes gelang deutlich besser. Wir konnten speziesspezifische Hybridisierungsoligonukleotide für Fadenpilze erstellen, deren Zielsequenzen im ITS 1-Bereich lagen. Durch exemplarische Testung einer Sonde wurde eine sensitive und spezifische Reaktion nachgewiesen.

Diese Arbeit präsentiert ein Protokoll, welches mittels RFLP-Analyse ein breites Spektrum klinisch relevanter Sproßpilzspezies mit wenig Aufwand und eindeutigen Ergebnissen nachweisen und identifizieren kann. Das Protokoll ermöglicht eine schnelle Erregerbestimmung und sollte in den meisten Routinelaboratorien durchführbar sein.

Auch eine Identifizierung von Fadenpilzen ist mit der etablierten RFLP-Analyse theoretisch möglich. Bevor die Methode auf Fadenpilze angewendet werden kann, müssen bessere Methoden für die Gewinnung der Fadenpilz-DNA entwickelt werden und die Sequenzinformationen in der Datenbank erweitert werden. Diese Arbeit stellt aus der Kombination der neu entwickelten Methoden zwei Strategien für die klinische Pilzdiagnostik vor. Damit können die wichtigsten humanpathogenen Sproß- und Fadenpilze in einem gemeinsamen Protokoll einfach und schnell identifiziert werden.