

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Etablierung und Evaluierung eines
Nachweisverfahrens klinisch relevanter
Zygomyceten anhand der
Polymerasekettenreaktion**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Friderike Schmitt

aus Würzburg

Würzburg, November 2014

Referent: APL-Professor Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Joachim Morschhäuser

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jörg Vogel

Dekan: Professor Dr.med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2016

Die Promovendin ist Ärztin

1. Einleitung	1
1.1. Erreger	1
1.1.1. Klinisch relevante <i>Zygomyceten</i>	1
1.1.2. Erregereigenschaften	2
1.1.3. Übertragungswege	2
1.2. Epidemiologie	3
1.2.1. Inzidenz und Prävalenz	3
1.2.2. Mortalität	3
1.3. Patientenkollektive und prädisponierende Faktoren	3
1.4. Ätiopathologie	4
1.4.1. Die Rolle des Immunsystems	4
1.4.2. Interaktionen mit dem Endothel	5
1.4.3. Die Rolle des Eisens	5
1.4.4. Die Rolle von Voriconazol	5
1.5. Klinische Manifestation	5
1.5.1. Pulmonaler Befall	6
1.5.2. Rhinocerebraler Befall	6
1.5.3. Befall der Haut	6
1.5.4. Gastrointestinaler Befall	6
1.5.5. Disseminierte Infektion	6
1.6. Diagnostik	7
1.6.1. Klinische Zeichen	7
1.6.2. Bildgebung	7
1.6.3. Mikroskopischer und histopathologischer Nachweis	7
1.6.4. Kultureller Nachweis	8

1.6.5. Molekularbiologische Nachweisverfahren.	9
1.6.6. Aktuelle Probleme in der Diagnostik.	10
1.7. Zielgene molekularbiologischer Nachweisverfahren.	10
1.8. Suszeptibilität.	11
1.9. Therapie.	12
1.9.1. Medikamentöse Therapie.	12
1.9.1.1. Polyene: Amphotericin B.	12
1.9.1.2. Azole: Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol.	13
1.9.1.3. Echinokandine: Caspofungin.	13
1.9.1.4. Allylamine: Terbinafin.	13
1.9.1.5. Kombinationstherapien.	13
1.9.2. Additive Therapien.	14
1.9.3. Chirurgische Therapie.	14
1.10. Prophylaxe.	14
1.11. Zielsetzung der Arbeit.	14
2. Material und Methoden.	16
2.1. Material.	16
2.1.1. Geräte.	16
2.1.2. Verbrauchsgegenstände.	16
2.1.3. Reagenzien.	17
2.1.4. Kits.	18
2.1.5. Primer und Sonden.	18
2.1.5.1. 18S-Assay.	18
2.1.5.2. 28S-Assay.	18
2.1.5.3. ITS2-Assay.	19

2.1.6. Untersuchungsmaterial.	19
2.1.6.1. Stammisolate aus Würzburger Kulturen.	19
2.1.6.2. Stammisolate aus Baseler Kulturen.	19
2.1.6.3. Klinische Proben, Basel.	20
2.1.6.3.1. Nativproben.	20
2.1.6.3.2. Formalin fixierte Proben.	20
2.1.6.4. Weitere <i>Mucorales</i>	20
2.1.6.5. <i>Non-Mucorales</i> , AG Löffler, Uniklinik Würzburg.	21
2.1.6.6. Pilz-DNA aus beimpftem Tiergewebe, Innsbruck.	21
2.1.6.6.1. Extrahierte DNA.	21
2.1.6.6.2. Gewebeproben.	21
2.1.6.7. BAL-Proben.	22
2.1.6.8. Sonstige DNA.	22
2.1.7. Fremdlabore und kooperierende Kliniken.	23
2.2. Methoden.	24
2.2.1. Anmerkungen zum Untersuchungsmaterial.	24
2.2.2. DNA-Extraktion.	24
2.2.3. DNA-Konzentrationsmessung.	25
2.2.4. PCR.	25
2.2.4.1. Prinzip der Real-time-PCR.	25
2.2.4.2. PCR-Design.	28
2.2.4.3. PCR-Reaktionsansatz.	29
2.2.4.4. Etablierung und Evaluierung der PCR.	30
2.2.4.4.1. Etablierung und Überprüfung der Sensitivität unter Verwendung der Stammisolate.	31

2.2.4.4.2. Überprüfung der Spezifität.	31
2.2.4.4.3. Überprüfung der klinischen Anwendbarkeit.	31
2.2.5. Gelelektrophorese.	32
2.2.6. Sequenzierung.	33
2.2.6.1. Prinzip und Durchführung der Sequenzierung.	33
2.2.6.2. Sequenzierte Proben.	33
2.2.7. Kontrollen.	34
2.2.7.1. Maßnahmen zur Qualitätssicherung und Kontaminationskontrolle.	34
2.2.7.2. Extraktionskontrolle.	34
2.2.7.3. Positivkontrolle.	35
2.2.7.4. Negativkontrolle.	35
3. Ergebnisse.	36
3.1. DNA-Extraktion.	36
3.2. Amplifikation der Stammisolate.	37
3.2.1. Amplifikation der Stammisolate im 18S- und 28S-System.	37
3.2.1.1. Verdünnung 10^{-1}	37
3.2.1.2. Verdünnungsreihen.	38
3.2.1.2.1. Verdünnung 10^{-3}	38
3.2.1.2.2. Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-12}	39
3.2.1.2.3. Triplikat.	44
3.2.2. Amplifikation der Stammisolate im ITS2-System.	45
3.2.2.1. Initiale Etablierung.	45
3.2.2.2. Amplifikation in niedrigen Verdünnungsstufen.	46
3.2.2.3. Amplifikation in mittleren Verdünnungsstufen.	47
3.2.2.4. Amplifikation in hohen Verdünnungsstufen.	48

3.2.3. Sensitivität der 3 Systeme im Vergleich.	50
3.3. Gelelektrophorese Stammisolate.	51
3.4. Sequenzierung Stammisolate.	53
3.5. Evaluierung der Spezifität.	54
3.5.1. PCR mit <i>Non-Mucorales</i>	54
3.5.2. PCR mit humaner und <i>Bacillus</i> -DNA.	56
3.6. Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit.	56
3.6.1. PCR mit klinischen Proben aus Basel.	56
3.6.1.1. Nativproben.	56
3.6.1.2. Formalin fixierte Proben.	57
3.6.2. PCR mit artifiziell infiziertem Gewebe aus Innsbruck.	58
3.6.2.1. PCR mit DNA-Extrakten.	58
3.6.2.2. PCR mit beimpften Gewebeproben.	61
3.6.3. PCR mit klinischen BAL-Proben.	66
4. Diskussion.	67
4.1. DNA-Extraktion.	67
4.2. Allgemeine Probleme der <i>Zygomyceten</i> -PCR.	68
4.3. Etablierung eines sensitiven PCR-Systems: 18S- und 28S-PCR.	68
4.4. Etablierung der ITS2-PCR.	69
4.5. Evaluierung der Spezifität.	71
4.6. Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit.	71
4.6.1. Klinische Gewebeproben, Basel, nativ.	71
4.6.2. Klinische Gewebeproben, Basel, Formalin fixiert.	71
4.6.3. Artifiziell infiziertes Gewebe.	72
4.6.4. Klinische BAL-Proben.	73

4.7. Vergleich der PCR-Systeme mit ähnlichen Projekten.	74
4.7.1. 18S-PCR.	74
4.7.2. 28S-PCR.	75
4.7.3. ITS2-PCR.	76
5. Ausblick.	77
6. Zusammenfassung.	78
7. Literaturverzeichnis.	79
8. Anhang.	84
8.1. Abkürzungsverzeichnis.	84
8.2. Tabellenverzeichnis.	87
8.3. Abbildungsverzeichnis.	89
8.4. Referenzstämme mit Zugangsnummern der Datenbank.	90
8.4.1. 18S-System.	90
8.4.2. 28S-System.	91
8.4.3. ITS2-System.	92

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Pilzinfektionen durch filamentöse Pilze aus der Klasse der *Zygomyceten* haben in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Während sie mittlerweile die drittäufigste Ursache für invasive Mykosen nach *Candida* und *Aspergillus* bei hämatoonkologischen und stammzelltransplantierten Patienten darstellen, bedeuten sie auch für Menschen mit Diabetes mellitus eine ernst zu nehmende Bedrohung (Petrikkos, Skiada et al. 2012).

1.1. Erreger

Die Klasse der *Zygomyceten* setzt sich zusammen aus den *Mucorales* und den *Entomophthorales*. Letztere sind sehr ungewöhnliche Erreger, deren Vorkommen sich üblicherweise auf tropische und subtropische Gebiete beschränkt, wo sie in der Mehrzahl kutane und subkutane, chronische Infektionen, überwiegend bei immunkompetenten Personen, hervorrufen. Auf sie soll hier nicht näher eingegangen werden.

Die ubiquitär vorkommenden *Mucorales* verursachen die meisten humanpathogenen Fälle. Nach direkter Angioinvasion destruieren sie das befallene Gewebe, wobei das Spektrum von kutanen, über pulmonale, rhinocerebrale bis hin zu disseminierten Manifestationen reicht. Der stets progrediente Verlauf endet nicht selten letal (Kwon-Chung 2012; Petrikkos, Skiada et al. 2012).

In dieser Arbeit werden die Begriffe „Zygomykose“ und „Mucormykose“ synonym verwendet, wobei darunter Erkrankungen zu verstehen sind, die durch ein beliebiges Mitglied der Familie der *Mucorales* verursacht wird. Ebenso werden unter dem Begriff „*Zygomyceten*“ stets nur die „*Mucorales*“ subsummiert.

1.1.1. Klinisch relevante *Zygomyceten*

Von den mehr als 300 Unterarten der *Zygomyceten* (White, James et al. 2006) finden sich die folgenden am häufigsten in klinischem Untersuchungsmaterial:

- *Rhizopus*
- *Mucor*
- *Cunninghamella*
- *Apophysomyces*
- *Lichtheimia* (ehemals *Absidia*)
- *Rhizomucor*
- *Saksenaea*

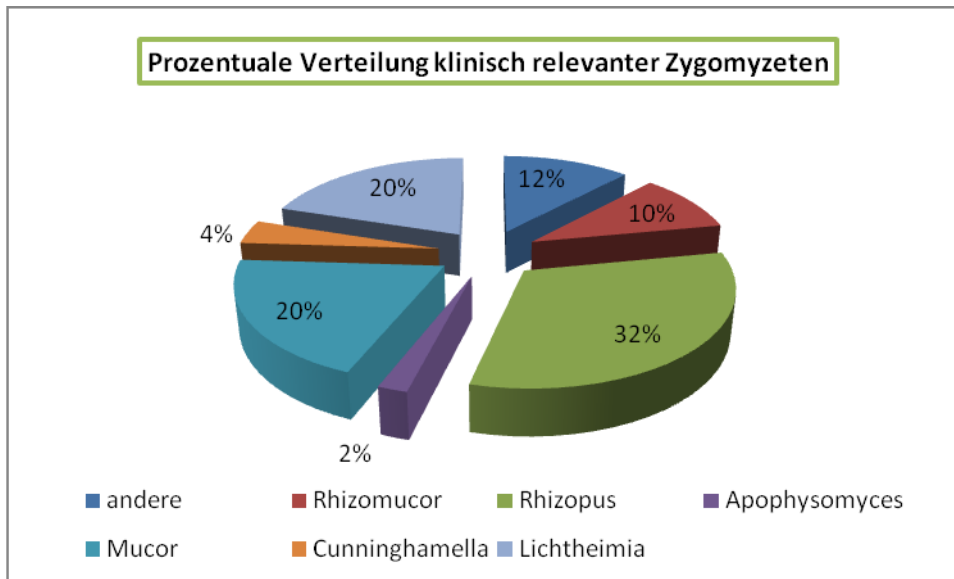


Abbildung 1: Prozentuale Verteilung klinisch relevanter *Zygomyceten* in einer Studie von Skiada et al., modifiziert nach (Petrikkos, Skiada et al. 2012)

Während 75% der *Mucormykosen* durch die Stämme *Rhizopus*, *Rhizomucor* und *Mucor* verursacht werden (Smith and Kauffman 2012), kommt es durch die seltenere Art *Cunninghamella bertholletiae* zu schwereren Krankheitsverläufen. Dagegen ist *Lichtheimia corymbifera* weniger häufig und virulent (Roilides, Kontoyiannis et al. 2012).

1.1.2. Erregereigenschaften

Die *Mucorales* sind ubiquitär vorkommende saprophytäre Schimmelpilze, die vor allem in verrottendem, organischen Material gefunden werden (Petrikkos, Skiada et al. 2012). Sie besitzen als überwiegend opportunistische Erreger (Greenberg, Scott et al. 2004) zwar nur wenige intrinsische Pathogenitätsfaktoren (Machouart, Larche et al. 2006), zeichnen sich aber durch große Anpassungsfähigkeit, rasches Wachstum und zum Teil Multidrug-Resistenz aus. Aufgrund ihrer hohen Affinität zu Blutgefäßen, sind sie in der Lage, sehr rasch zu disseminieren und sich einer Immunantwort zu entziehen (Kontoyiannis, Lewis et al. 2012).

1.1.3. Übertragungswege

Die häufigsten Übertragungswege bestehen in der inhalativen Aufnahme der aerogen verbreiteten Sporangiosporen, sowie der Inokulation über Haut und Schleimhäute, deren Integrität gestört ist. Des Weiteren ist eine Infektion über kontaminierte Lebensmittel und Medizinprodukte, wie zum Beispiel Mundspatel, möglich (Petrikkos, Skiada et al. 2012). Von einer Verbreitung über intravenöse Katheter oder subkutane Injektionen wurde ebenfalls berichtet (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.2. Epidemiologie

1.2.1. Inzidenz und Prävalenz

In den vergangenen Jahren ist die Zahl invasiver Pilzinfektionen signifikant angestiegen, was unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass die Lebenserwartung in den Risikokollektiven zunimmt und immunsuppressive Medikamente, die opportunistische Infektionen begünstigen, in immer größerem Umfang zum Einsatz kommen (Zhao, Li et al. 2011). Auch die steigende Prävalenz von Diabetes mellitus trägt zur Erhöhung der Fallzahlen bei (Skiada, Pagano et al. 2011).

Trotz dieser offensichtlichen Zunahme invasiver *Zygomycosen* in den vergangenen zwei Jahrzehnten, erscheint es kaum möglich, die genaue Inzidenz anzugeben.

Dies liegt zum einen daran, dass die Zahl der Autopsien, die die definitive Diagnose erlauben, durchgehend rückläufig ist. Aktuell wird der Anteil der autopsisch nachgewiesenen Fälle an allen Pilzinfektionen mit 8,3 bis 13% angegeben.

Zum anderen gehen Fälle nicht in die Statistik ein, weil ein definitiver Nachweis zu Lebzeiten oft nicht gelingt. In den wenigen zur Verfügung stehenden Studien schwanken die Angaben zwischen 0,43 und 1,7 pro Million (Petrikkos, Skiada et al. 2012).

Die Prävalenz wird für Risikokollektive mit 2 bis 3% angegeben (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.2.2. Mortalität

Bei einer Gesamtmortalitätsrate von über 50% (Ibrahim, Spellberg et al. 2012) variiert die Zahl der Todesfälle in Abhängigkeit von der Lokalisation mit 85% für gastrointestinale, 76% für pulmonale und 96% für disseminierte Infektionen. Diabetische Patienten versterben zu 44%, während onkologische sogar in 66% einen fatalen Verlauf aufweisen (Petrikkos, Skiada et al. 2012).

1.3. Patientenkollektive und prädisponierende Faktoren

Allgemein gilt, dass jede Beeinträchtigung oder Fehlfunktion des Immunsystems eine Infektion durch *Zygomyzeten* begünstigt.

Am häufigsten betroffen sind hämatookologische Patienten, insbesondere mit akuter myeloischer Leukämie, in Phasen der Aplasie, nach Stammzelltransplantation und mit Graft-versus-host-Disease. Auch die Transplantation solider Organe stellt einen prädisponierenden Faktor dar.

Ein zweites großes Risikokollektiv bilden Patienten mit Diabetes mellitus, vor allem bei schlecht eingestellter Stoffwechsellage und im Zustand der Ketoazidose.

Gefährdet sind auch Personen mit gestörten Haut- oder Schleimhautbarrieren, insbesondere Schwerstbrandverletzte, Frühgeborene, i.v.-Drogenabhängige und mangelernährte Menschen.

Allerdings erkranken in seltenen Fällen auch gesunde, immunkompetente Individuen.

Iatrogen können *Mucormykosen* begünstigt werden durch Zytostatikatherapie, sowie den langfristigen Einsatz von Glukokortikoiden, die die Funktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beeinträchtigen und eine diabetische Stoffwechsellage verursachen können. Ähnliches gilt für die Verwendung von Breitspektrumantibiotika, die über eine Veränderung der bakteriellen Mikroflora die Etablierung der Pilze ermöglichen. Desferoxamin zur Behandlung der Eisenüberladung bei Dialysepatienten und eine Dauerinfektionsprophylaxe mit Voriconazol sollen ebenfalls zu invasiven *Zygomykosen* prädisponieren.

Nosokomiale Fälle im Zusammenhang mit verunreinigten Luftfiltern, sowie dem Einsatz kontaminierter medizinischer Produkte, wie z. B. Mundspatel, Wundverbände oder intravenöse Katheter, wurden in der Vergangenheit beobachtet.

(Radner, Witt et al. 1995; Ribes, Vanover-Sams et al. 2000; Spellberg, Edwards et al. 2005; Petrikos, Skiada et al. 2012; Vitale, de Hoog et al. 2012)

1.4. Ätiopathologie

1.4.1. Die Rolle des Immunsystems

Während die Erreger in immungesunden Individuen bereits unmittelbar nach Eintritt in den Körper durch Makrophagen und andere phagozytierende Zellen bekämpft werden (Roilides, Kontoyiannis et al. 2012), können sie sich in immunsupprimierten Individuen ungestört verbreiten. Nach Etablierung der Infektion reagiert das Immunsystem normalerweise mit der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, die durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, wie Interleukin 6 oder TNF α , und Chemokine angelockt werden. Diese schädigen die Erreger, indem sie sie mit ihren oxidativen zytotoxischen Systemen schädigen und schließlich abtöten. Allerdings kann dieser sog. „oxidative burst“ in immunkompromittierten Individuen nicht mehr effektiv ablaufen (Ribes, Vanover-Sams et al. 2000), weshalb es zu einer invasiven Infektion kommt (Eucker, Sezer et al. 2001).

1.4.2. Interaktionen mit dem Endothel

Die von *Zygomyceten* ausgelöste Thrombosierung und Zerstörung wird ermöglicht durch die Fähigkeit zur Angioinvasion. Diese kann erst dadurch stattfinden, dass Pilzsporen sich an subendotheliale Matrixproteine, wie zum Beispiel Laminin und Kollagen Typ IV, anheften. Nach Endozytose in die Endothelzellen, werden diese zerstört (Ibrahim, Spellberg et al. 2012).

Neuerdings ist bekannt, dass auch das sogenannte „Glucose-related-Protein“ GRP78, das im diabetischen Stoffwechsel hochreguliert wird, den Mucorales als Rezeptor auf Endothelzellen dienen kann (Liu, Spellberg et al. 2010).

Interessanterweise wird das Gewebe aber nicht nur durch vitale Erreger, sondern auch durch bereits abgetötete Formen geschädigt, was erklären könnte, weshalb Medikamente nicht mehr wirken, wenn die Pilze bereits im Organismus etabliert sind (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.4.3. Die Rolle des Eisens

Individuen, die einen erhöhten Eisengehalt im Serum aufweisen, z.B. unter Therapie mit dem Eisenchelator Desferoxamin, tragen ein deutlich größeres Risiko, an *Mucormykosen* zu erkranken, da die Pilze aufgrund des hohem Eisenspiegels sehr gute Wachstumsbedingungen vorfinden (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.4.4. Die Rolle von Voriconazol

Da Voriconazol sich gegenüber anderen humanpathogenen Pilzen, wie *Candida* und *Aspergillus*, als gut wirksam erweist, ist es denkbar, dass durch deren Elimination eine Kolonisierung durch *Zygomyceten* erst begünstigt wird. Ein weiterer Erklärungsansatz beruht darauf, dass Voriconazol das Überleben schwer immunkompromittierter Patienten, die früher nach Transplantation verstorben wären, erst ermöglicht und sie im Folgezeitraum Infektionen durch *Zygomyceten* akquirieren (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.5. Klinische Manifestation

Obwohl *Zygomyceten* prinzipiell jedes Organ in Mitleidenschaft ziehen können, werden sechs Hauptmanifestationsformen unterschieden:

Pulmonal, rhinozerebral, kutan, gastrointestinal, disseminiert sowie eher ungewöhnliche Formen wie Endokarditis oder Osteomyelitis (Petrikos, Skiada et al. 2012).

1.5.1. Pulmonaler Befall

Der Befall der Lunge steht bei stammzelltransplantierten Patienten und während Phasen der Neutropenie an erster Stelle (Spellberg, Edwards et al. 2005), wobei die Symptome meist sehr unspezifisch sind. Die Betroffenen zeigen oft prolongierte Episoden hohen, antibiotikaresistenten Fiebers und unproduktiven Husten. Neben Hämoptysen, Pleuraschmerzen und Dyspnoe ist eine Ausbreitung auf benachbarte Organe wie Mediastinum, Perikard und Thoraxwand möglich, aber eher selten (Ribes, Vanover-Sams et al. 2000). In der Bildgebung zeigen sich noduläre und bandförmige Infiltrate, reverse Halozeichen, Kavernen, Atelektasen und Pleuraergüsse (Chamilos, Marom et al. 2005; Wahba, Truong et al. 2008; Petrikkos, Skiada et al. 2012; Walsh, Gamaletsou et al. 2012).

1.5.2. Rhinocerebraler Befall

Diese häufigste Manifestationsform macht ca. ein Drittel bis die Hälfte aller *Mucormykosen* aus und zieht bevorzugt Patienten mit Diabetes mellitus in Mitleidenschaft. Nach einer initialen Sinusitis kommt es unter heftigen Schmerzen zu Taubheitsgefühl im Gesicht, Lidödem, Exophthalmus und Verschwommensehen. Der Befall der Orbita führt häufig zur Erblindung. Invadiert der Erreger schließlich auch das ZNS, reicht die Bandbreite von Hirnnervenausfällen bis hin zu hämorrhagischen Infarkten (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.5.3. Befall der Haut

Nach Ausbildung einer erythematösen Induration, schreitet die Infektion rasch bis zum Bild eines Pyoderma gangränosum oder einer nekrotisierenden Fasiitis fort (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.5.4. Gastrointestinaler Befall

Neben völlig unspezifischen Symptomen wie Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen (Spellberg, Edwards et al. 2005), reicht das Spektrum von Appendizitis, nekrotisierender Enterokolitis, Pankreatitis, über Organperforationen bis hin zur generalisierten Peritonitis (Petrikkos, Skiada et al. 2012).

1.5.5. Disseminierte Infektion

Ausgehend von Lunge, Magendarmtrakt und großflächigen Wunden, variiert das Erscheinungsbild in Abhängigkeit von der Grunderkrankung des Patienten und dem Grad der Gewebeerstörung (Petrikkos, Skiada et al. 2012). Am häufigsten wird jedoch das Gehirn befallen, durch Abszessbildung und Infarzierungen entwickeln die

Betroffenen neurologische Ausfälle oder werden komatös (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.6. Diagnostik

Aufgrund des rasch progredienten Verlaufs von *Zygomycosen*, ist eine rasche und zuverlässige Diagnosestellung für das Überleben des Patienten essentiell. Sie setzt sich in der Regel zusammen aus der Beurteilung der klinischen Symptome, bildgebenden und labortechnischen Nachweisverfahren (Walsh, Bloom et al. 2012).

1.6.1. Klinische Zeichen

Wie bereits angeführt, sind die klinischen Symptome meist so unspezifisch, dass sie in den seltensten Fällen unmittelbar zur Diagnose „*Mucormykose*“ führen.

1.6.2. Bildgebung

Neben dem konventionellen Röntgen kommen die Computertomografie und vereinzelt auch die Magnetresonanztomografie zum Einsatz. Hiermit gelingt die definitive Diagnosestellung ebenfalls selten, allerdings kann die Computertomografie in manchen Fällen Frühzeichen aufdecken, bevor klinische Symptome in Erscheinung treten (Walsh, Bloom et al. 2012).

1.6.3. Mikroskopischer und histopathologischer Nachweis

Die histopathologische Untersuchung wird an bioptisch entnommenen Gewebeproben oder CT-gestützten Feinnadelaspiraten durchgeführt (Hammond, Bialek et al. 2011), die nach Formalinfixation in Paraffinwachs eingebettet und dann beispielsweise mit Gomori-Methenamin-Silber gefärbt werden (Dannaoui, Schwarz et al. 2010). Eine Färbung mit dem üblicherweise verwendeten Hematoxylin oder Eosin ist bei *Zygomyceten* oft nicht möglich (Greenberg, Scott et al. 2004). In der Mikroskopie zeigt sich dann ein typisches morphologisches Bild der Sporangiosporen und breiten, nahezu unseptierten Hyphen, die sich im rechten Winkel verzweigen (Schwarz, Bretagne et al. 2006).

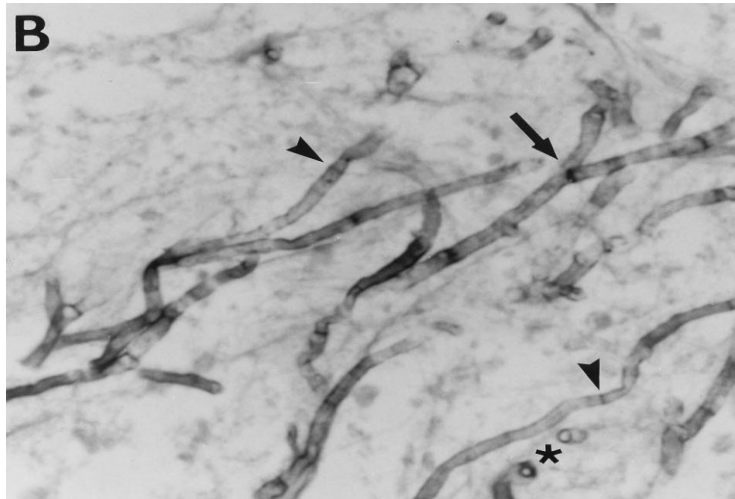


Abbildung 2: Mikroskopische Morphologie von *Rhizopus species* (Ribes, Vanover-Sams et al. 2000)

Die Detektion von Hyphen im Zusammenhang mit Gewebeschäden beweist die invasive Infektion, selbst wenn die Kultur negativ bleibt (Dannaoui, Schwarz et al. 2010). Die Abgrenzung gegenüber anderen filamentösen Pilzen gelingt meist (Walsh, Gamaletsou et al. 2012), allerdings können anhand der Morphologie die Unterarten der *Mucorales* nicht identifiziert werden.

1.6.4. Kultureller Nachweis

Der kulturelle Nachweis ist derzeit noch die gebräuchlichste Methode, um die Erreger einer invasiven *Zygomycose* zu identifizieren (Schwarz, Bretagne et al. 2006), zeigt aber laut verschiedenen Studien bei der Anzucht aus autoptischem Material nur eine Sensitivität von 52%, aus chirurgisch gewonnenen Proben sogar nur von 30% (Machouart, Larche et al. 2006). Am besten eignen sich infarzierte, stark eingeblutete Gewebe, während der Nachweis aus anderen Untersuchungsmaterialien, wie z. B. BAL-Flüssigkeit und Serum zwar prinzipiell möglich ist, aber oft erfolglos bleibt (Einsele, Hebart et al. 1997; Eucker, Sezer et al. 2001; Greenberg, Scott et al. 2004). Werden die Hyphen während der Aufbereitung der Proben zerstört, findet kein Wachstum mehr statt (Lau, Chen et al. 2007). Auch die Tatsache, dass die Patienten oft schon bereits einige Zeit mit fungiziden Medikamenten vorbehandelt sind, trägt dazu bei, dass die kulturelle Anzucht häufig misslingt (Rickerts, Mousset et al. 2007). Letztlich ist aufgrund des ubiquitären Vorkommens der Sporen in Luft, Nahrungsmitteln und Staub die Unterscheidung zwischen Kontamination und echter Infektion bisweilen schwierig. Man kann von einem signifikanten Befall ausgehen, wenn die Erreger in normalerweise sterilen, oder wiederholt in großer Kolonienzahl in unsterilem Gewebe nachgewiesen werden (Greenberg, Scott et al. 2004).

1.6.5. Molekularbiologische Nachweisverfahren

Molekularbiologische Nachweisverfahren sind ein wichtiges Werkzeug, um die klinisch-histopathologisch gestellte Diagnose valide zu verifizieren oder falsifizieren (Hammond, Bialek et al. 2011). Darüberhinaus gelingt durch sie eine Identifizierung häufig auch dann, wenn die kulturelle Anzucht gescheitert ist (Rickerts, Mousset et al. 2007). Allerdings wird die molekulare Typisierung, die bereits für viele Pilzarten etabliert ist, bei den *Zygomyceten* erst seit relativ kurzer Zeit praktiziert (Nagao, Ota et al. 2005). Sie gewinnt aber aus verschiedenen Gründen zunehmend an Bedeutung: Zum einen findet gerade ein starker Wandel in der Epidemiologie klinisch relevanter Pilze statt, neue Organismen, die bisher keine Rolle gespielt haben, treten nun als humanpathogene Erreger in Erscheinung. Des Weiteren finden sich innerhalb dieser Arten speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten. Letztlich haben zahlreiche Studien gezeigt, dass die bloße Identifizierung anhand der Morphologie keine suffiziente Methode zur Speziesbestimmung darstellt.

Als heutiger Goldstandard gelten sogenannte komparative sequenzbasierte Identifikationsmethoden, die auf der Amplifikation ausgewählter Genregionen mittels PCR und anschließender Sequenzierung der Amplifikate beruhen. Über den Abgleich von Konsensussequenzen mit Datenbanken ist dann die Speziesidentifizierung möglich (Balajee, Borman et al. 2009).

Bevorzugt kommt die Real-time-PCR zum Einsatz. Sie wird aufgrund der hohen Sensitivität, der gleichzeitigen Möglichkeit der Quantifizierung, der deutlich reduzierten Kontaminationsgefahr und der Schnelligkeit des Verfahrens heute allgemein favorisiert (Hata, Buckwalter et al. 2008; Millon, Grenouillet et al. 2011).

Die anschließende Sequenzierung ermöglicht es, sowohl *Zygomyceten* von anderen Pilzen zu unterscheiden, als auch die verschiedenen *Mucorales*-Spezies sicher zu identifizieren (Bialek, Konrad et al. 2005; Machouart, Larche et al. 2006; Schwarz, Bretagne et al. 2006). Da sie allerdings relativ viel Zeit in Anspruch nimmt, bevorzugen einige Forschungsgruppen schnellere Methoden, wie z. B. Schmelzkurvenanalyse (Hrncirova, Lengerova et al. 2010) oder Reverse-line-blot-Hybridisierung (Zhao, Li et al. 2011).

Leider muss darauf hingewiesen werden, dass die effizienten molekularbiologischen Verfahren häufig experimentellen Charakter haben und in der klinischen Routinediagnostik noch nicht fest etabliert sind.

1.6.6. Aktuelle Probleme in der Diagnostik

Bis heute existieren keine einheitlichen Routinenachweisverfahren für *Zygomyceten*. Im Gegensatz zu anderen Erregern können diese Pilze nicht über serologische Tests, etwa auf spezifische Antigene, zuverlässig detektiert werden. Auch der Nachweis über Blutkulturen, Liquor, Sputum, Urin, Stuhl oder Abstrichmaterial gelingt selten (Loeffler, Henke et al. 2000; Spellberg, Edwards et al. 2005; Schwarz, Bretagne et al. 2006; Kasai, Harrington et al. 2008; Nakamura, Sugimoto et al. 2010). Bildgebende Verfahren bleiben oft negativ oder hinken dem raschen klinischen Progress hinterher, so dass Biopsien gewissermaßen „blind“ bei dem geringsten klinischen Verdacht durchgeführt werden müssten, was aber aufgrund der Unerfahrenheit der Ärzte mit *Mucormykosen* oft nicht geschieht (Spellberg, Edwards et al. 2005). Die histopathologische Diagnosestellung hängt sehr stark von der Erfahrung und dem Können des Untersuchers ab (Nagao, Ota et al. 2005). Bis zur endgültigen Gewebepräparation vergehen oft einige, für die Prognose des Patienten entscheidende, Tage, und selbst dann stellen sich die oft nur schwach anfärbbaren, zarten Hyphen häufig nicht dar (Hata, Buckwalter et al. 2008). Zudem kann die Biopsiegewinnung bei den schwerkranken Patienten Probleme bereiten, etwa bei Vorliegen einer Koagulopathie (Walsh, Bloom et al. 2012) oder beim Befall tiefliegender, viszeraler Organe (Nagao, Ota et al. 2005).

Auch wenn sich in der Kultur ein Wachstum findet, ist die Artzuordnung sehr zeitaufwändig und oft nur durch ein Referenzlabor möglich (Schwarz, Bretagne et al. 2006).

Problematisch gestaltet sich auch der Nachweis von Mischinfektionen, die laut einer Fallserie bei über 40% der Patienten mit *Zygomykosen* auftreten (Kontoyiannis, Wessel et al. 2000).

Selbst molekulargenetische Verfahren können bei der Speziesidentifizierung gewisse Probleme nach sich ziehen, etwa wenn die Zielgene große Homologien zeigen (Nagao, Ota et al. 2005) oder beim Abgleich mit den Datenbanken, die in bis zu 20% Fehler in den angegebenen Sequenzen aufweisen (Balajee, Borman et al. 2009).

1.7. Zielgene molekularbiologischer Nachweisverfahren

Um Pilze auf molekularer Ebene zu identifizieren, werden meist Multi-copy-Gene der ribosomalen DNA verwendet (Bialek, Konrad et al. 2005). Diese sind dazu besonders geeignet, weil sie sowohl konservierte Regionen besitzen, die das Design sogenannter Broad-range-Primer ermöglichen, als auch variable Abschnitte, anhand derer man die verschiedenen Pilze voneinander unterscheiden kann (Khot, Ko et al. 2009).

Die ribosomale DNA setzt sich zusammen aus codierenden Bereichen mit zum Teil hochkonservierten Abschnitten und dazwischen liegenden sogenannten Internal-transcribed-Spacer-Regionen (ITS), die aufgrund einer höheren Mutationsfrequenz eine größere Heterogenität aufweisen.

Das ribosomale Operon der Pilze besteht aus der 18S-Region, ITS1, der 5,8S-Sequenz, ITS2 und der 28S-Region.

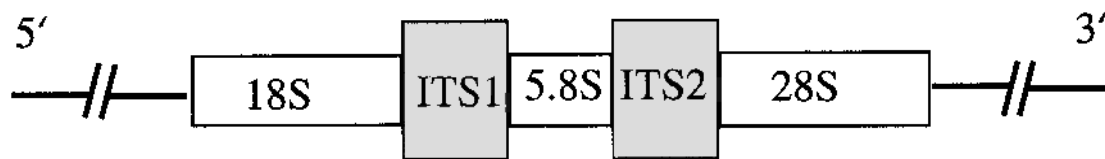


Abbildung 3: Das ribosomale Operon der Pilze (Iwen, Hinrichs et al. 2002)

Während 18S, 5,8S und 28S aufgrund ihrer hohen Konservierung zur Analyse phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse herangezogen werden, variieren die ITS-Bereiche stark zwischen verschiedenen Arten und Gattungen, so dass diese anhand dieser Region voneinander unterschieden werden können.

Der etwa 1800bp lange 18S- Genabschnitt besteht sowohl aus variablen, als auch aus konservierten Sequenzen, die ausgeprägte Homologien innerhalb der verschiedenen Pilzgattungen zeigen und es daher erlauben, die *Mucorales* von anderen Pilzen zu unterscheiden (Iwen, Hinrichs et al. 2002; Abe, Oda et al. 2006; Machouart, Larche et al. 2006).

Ähnlich verhält es sich mit der ca. 3400bp langen 28S-Region.

Die ITS-Region dagegen zeigt innerhalb der Gattungen auch bis zu 98% übereinstimmende Sequenzen, variiert aber zwischen den einzelnen Spezies sehr stark, so dass meist eine eindeutige Identifizierung möglich ist. Dies hat dazu geführt, sie als sog. „Barcode-Gen“ der *Zygomyceten* zu bezeichnen (Schwarz, Bretagne et al. 2006). Demzufolge gilt die sequenzbasierte Identifikation dieser Region anhand einer PCR mit den panfungalen Primern ITS1 und 2 als Mittel der Wahl, wenn kulturell angezüchtete *Mucorales* auf der Speziesebene unterschieden werden sollen (Dannaoui, Schwarz et al. 2010).

1.8. Suszeptibilität

Grundsätzlich gestaltet sich die Therapie invasiver *Mucormykosen* wesentlich schwieriger, als bei anderen systemischen Pilzinfektionen, weil *Zygomyceten* zwei- bis zehnfach so viele Gene besitzen, die für die Ergosterol- und Zellwandbiosynthese,

Zellwachstum, Eisenaufnahme und Pathogenitätsfaktoren codieren. Hierdurch werden sie zu einer sehr widerstandsfähigen Gattung mit einer rigiden Zellwand und Zellmembran, weshalb sie durch zahlreiche antifungale Medikamente schwer angreifbar sind. Diese genomische Plastizität begünstigt ebenfalls die Entwicklung von Resistenzen (Lewis, Lortholary et al. 2012).

Eine weitere Besonderheit der *Mucorales* besteht darin, dass sowohl zwischen den einzelnen Familien, als auch auf Ebene der Gattung, Art und Stämme z. T. beträchtliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten bestehen (Schrodl, Heydel et al. 2012; Vitale, de Hoog et al. 2012).

Dies verdeutlicht die Wichtigkeit, die verschiedenen Untergruppen voneinander differenzieren zu können, da aufgrund der nachgewiesenen Resistenzen eine einheitliche Behandlung der *Zygomyceten* in der klinischen Praxis nicht optimal erscheinen kann.

1.9. Therapie

Ein frühzeitiger Therapiebeginn ist zum einen wichtig, um die Überlebenschance der betroffenen Patienten zu verbessern, da gezeigt werden konnte, dass ein verzögertes Eingreifen die Mortalitätsrate innerhalb von zwölf Wochen verdoppelt (Chamilos, Marom et al. 2005). Zum anderen lässt sich nur so die Radikalität der erforderlichen chirurgischen Eingriffe, die oft zu einer starken Entstellung führen und für die Patienten sehr belastend sind, in gewissen Grenzen halten (Walsh, Gamaletsou et al. 2012).

Nach einer raschen Diagnosestellung müssen, falls möglich, zunächst prädisponierende Faktoren beseitigt werden. Hierunter fallen z. B. der Ausgleich einer Azidose und Hyperglykämie oder eine Reduzierung des immunsuppressiven Regimes.

Die Auswahl des geeigneten Medikaments wird durch die Tatsache erschwert, dass aufgrund der geringen Fallzahlen bisher nur wenige randomisierte Studien über das optimale therapeutische Vorgehen bei invasiven *Zygomycosen* durchgeführt werden konnten. Dies hat zur Folge, dass die behandelnden Ärzte sich auf eine geringe Zahl retrospektiver Reviews und Erfahrungswerte aus – oft wenig objektiven – Fallberichten stützen müssen (Walsh, Gamaletsou et al. 2012).

1.9.1. Medikamentöse Therapie

1.9.1.1. Polyene: Amphotericin B

Amphotericin B gilt als Mittel der Wahl in der Behandlung von *Zygomycosen* (Ribes, Vanover-Sams et al. 2000), sollte aber stets in der liposomalen Darreichungsform

verwendet werden, um bei reduzierter Nephrotoxizität höhere Dosen verabreichen zu können. Allerdings ist die optimale Dosierung nicht bekannt (Lewis, Lortholary et al. 2012), da der Befall sehr unterschiedlicher Kompartimente, wie z. B. Lunge oder ZNS, variierende Anforderungen an die Pharmakodynamik stellt.

1.9.1.2. Azole: Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol

Da nicht alle *Zygomyceten* gegenüber Itraconazol empfindlich sind, sollte es lediglich in speziell ausgewählten Fällen als Zweitlinientherapie in Erwägung gezogen werden (Spellberg, Edwards et al. 2005).

Voriconazol hat sich nicht nur als unwirksam erwiesen, sondern kann, wenn es zur Infektionsprophylaxe von *Aspergillose*n eingesetzt wird, eine Durchbruchinfektion mit *Mucorales* begünstigen (Alastruey-Izquierdo, Castelli et al. 2009).

Posaconazol hingegen zeigt in vitro eine mit Amphotericin B vergleichbar gute Wirkung (Rogers 2008), so dass es durchaus eine Möglichkeit in therapierefraktären Fällen darstellen kann (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.9.1.3. Echinokandine: Caspofungin

Obwohl Caspofungin in vitro nur eine minimale Wirkung gegen *Zygomyceten* aufweist, wirkt es im Tierversuch synergistisch mit Amphotericin B.

Insgesamt ist die Bedeutung der Echinokandine noch nicht endgültig geklärt, so dass sie bis jetzt nur als Zweitlinienmedikamente in Kombination mit Amphotericin B zum Einsatz kommen sollten (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.9.1.4. Allylamine: Terbinafin

Terbinafin wies in den wenigen durchgeführten Studien eine sehr variable Wirksamkeit gegenüber den verschiedenen Arten auf. Während sich der häufigste Erreger invasiver *Zygomycosen*, *Rhizopus oryzae*, resistent zeigte, wirkt dieses Medikament gut gegen den ansonsten multiresistenten Stamm *Cunninghamella*. Demnach könnte der Einsatz im Rahmen einer Kombinationstherapie sinnvoll sein (Alastruey-Izquierdo, Castelli et al. 2009; Vitale, de Hoog et al. 2012).

1.9.1.5. Kombinationstherapien

Zwar ist ein kombinierter Einsatz der aufgeführten Medikamente in der klinischen Praxis noch nicht fest etabliert, die inakzeptabel hohen Mortalitätsraten unter Monotherapie und erste gute Erfolge von Kombinationstherapien in Studien lassen jedoch hoffen, dass sich dies in Zukunft ändern wird (Spellberg, Ibrahim et al. 2012).

1.9.2. Additive Therapien

Supportiv können die Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF eingesetzt werden, die über eine Steigerung der Anzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten zu einer Beschleunigung der Immunrekonstitution beitragen (Roilides, Kontoyiannis et al. 2012). Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von hyperbarem Sauerstoff dar, der die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten, Erreger abzutöten, verbessern soll und in vitro das Wachstum der Pilze behindert (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.9.3. Chirurgische Therapie

Ein rasches, teilweise aggressives chirurgisches Débridement ist oft erforderlich, um die weitere Ausbreitung der Infektion einzudämmen und so die Heilungsraten zu erhöhen, respektive die Mortalität zu senken (Spellberg, Edwards et al. 2005).

1.10. Prophylaxe

Im Gegensatz zu anderen Pilzarten existiert für die *Mucorales* keine medikamentöse Prophylaxe. Daher besteht die einzige Option darin, die Exposition gefährdeter Patienten möglichst gering zu halten, etwa durch Umkehrisolation in Zimmern mit speziellen Luftfiltern und einem künstlich erzeugten Überdruck. Wichtig ist es auch, während baulicher Maßnahmen die Luftqualität besonders sorgfältig zu überwachen.

Letztendlich wird das Risiko derartig invasiver Infektionen aber am wirkungsvollsten durch eine optimale Behandlung der Grunderkrankung reduziert (Ribes, Vanover-Sams et al. 2000).

1.11. Zielsetzung der Arbeit

Invasive *Zygomycosen* stellen eine zu nehmende Bedrohung für immunsupprimierte Individuen dar.

Da die klassischen mikrobiologischen Verfahren den Nachweis und die korrekte Identifizierung oft nicht, oder nur mit Verzögerung erlauben, ist die Entwicklung molekularer Methoden, die die Detektion rasch und zuverlässig ermöglichen, für die schwer kranken Patienten essentiell. Nur so kann eine adäquate Therapie rechtzeitig eingeleitet und das Leben der Betroffenen gerettet werden.

Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Real-time-PCR-Assays entwickelt, die fungale ribosomale Gene als Zielstrukturen verwenden und somit den sensitiven und spezifischen Nachweis einer Infektion mit *Zygomyceten* und deren Identifikation ermöglichen sollen.

Der erste Teil des Projekts bestand in der Etablierung einer Real-time-PCR, in der ein ca. 180bp langes Fragment des 18S-RNA-Gens der *Zygomyceten* amplifiziert wurde. Hierbei handelt es sich um eine Region, die geeignet ist, *Mucorales* von anderen Pilzen zu unterscheiden. In Anlehnung an eine Arbeit von Bialek (Bialek, Konrad et al. 2005) wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen:

Im Gegensatz zur Originalarbeit kam statt einer Semi-nested-PCR ein Real-time-Verfahren zum Einsatz. Dieses bietet neben einer deutlich verringerten Kontaminationsgefahr den Vorteil, dass die Quantifizierung der Amplifikate unmittelbar möglich ist. Mit dem Ziel eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen, wurde diese PCR als Taqman-Assay durchgeführt. In gleicher Intention wurden im Vergleich zum Projekt von Bialek et al. verlängerte Primer und eine LNA-Sonde verwendet, die es erlaubten, mit einer höheren Annealingtemperatur zu arbeiten. Eine Sequenzierung der Amplifikationsprodukte schloss sich an.

Der zweite Teil des Experiments befasste sich mit der Detektion eines 110bp langen Fragments des 28S-RNA-Gens der *Zygomyceten*, ebenfalls unter Verwendung einer Real-time-Taqman-PCR, wobei diesmal eine herkömmliche Sonde eingesetzt wurde.

Dieser konservierte Bereich des ribosomalen Operons, der für die große Untereinheit des Ribosoms codiert, ist ebenfalls geeignet, *Mucorales* von anderen Pilzarten abzugrenzen. Der Fokus richtete sich hier auf die Etablierung einer sehr sensitiven Methode, was durch die Verwendung des sehr kurzen Fragments erreicht werden sollte.

Im dritten Teil wurde eine Real-time-PCR getestet, die die sogenannte ITS-Region des ribosomalen Operons als Zielstruktur hatte. Wie bereits erläutert, eignet sich dieser Bereich optimal, um verschiedene *Mucorales* voneinander zu unterscheiden. Die Besonderheit dieses Assays lag darin, dass die Sonde am Ende der ITS2-Region im 28S-Abschnitt platziert wurde, der hochkonserviert ist, die Primer dagegen speziesspezifische Bereiche flankieren. Nach Amplifikation des 400 bis 500 bp langen Fragments wurde dieses sequenziert, um eine exakte Speziesidentifizierung vornehmen zu können. Diese wird in Zukunft in der klinischen Praxis eine entscheidende Rolle spielen, da, wie bereits angeführt, die einzelnen Unterarten in ihrer Suszeptibilität gegenüber antifungalen Medikamenten differieren und nur durch eine adäquate Auswahl eine optimale Therapie gewährleistet wird.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gelkammer	40-0911	Peqlab, Erlangen
Hood	DNA/RNA UV-Cleaner	UVC/T-AR
Kühlschränke	Premium Premium No Frost	Liebherr Liebherr AEG-Electrolux
Mikrowelle		Micromaxx
PCR-System	Step One Plus Real-Time-PCR-Gerät	Applied Biosystems
Photometer	Alphalmager	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipetten	Reference 10µl, 100µl, 1000µl, Research 20µl	Eppendorf, Köln
Präzisionswaage	GF- 2000	A&D Instruments
Sicherheitswerkbank	Hera-Safe	Heraeus, Hanau
Spannungsinduktor	Standard Power Pack 25	Biometra, Göttingen
Spectrometer	Nano-Drop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Vortexgerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert WB7	Memmert
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D Centrifuge 5415 R Thermo Scientific Multifuge 3 S- R, S-3 Galaxy Mini	Eppendorf, Köln Eppendorf, Köln Heraeus, Hanau VWR , München

2.1.2. Verbrauchsgegenstände

Tabelle 2: Verbrauchsgegenstände

Ceramic Beads	MagNA Lyser Green Beads	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Einmalhandschuhe	Sensi Care Ice	Medline
Extraktionssäulen	High Pure Spin filter Tubes	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Klebefolie	Klebefolie optisch klar	Sarstedt
Ösen	Einmalösen,BSV 120	A. Hartenstein
PCR-Platte	Multiply Fast PCR-Platte	Sarstedt

Pipettenspitzen	Safe Seal Tips professional 10µl, 1250µl Tip One, Star Lab, 100µl, 1000µl	Biozym Diagnostik, Oldendorf Starlab GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße	Collection Tubes Eppendorf Tubes, 1,5ml, 2ml Falcon, 15ml Cellstar Tubes Safe lock Elution Tubes, 1,5ml Messzylinder, 50ml, 100ml	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Eppendorf, Deutschland Greiner bio one Qiagen Plasti Brand
Vernichtungsbeutel	200x300mm	A. Hartenstein
Verschlussfolie	Parafilm M	Brand GmbH&CO KG, Wertheim

2.1.3. Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Agarose	NEED Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aqua purificata		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Ethanol absolute 99,8%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid		Fluka (Sigma-Aldrich) Buchs,CH
Gel-Marker	READY-LOAD 100bp Ladder	invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinase K	rekombinant, lyophilisiert	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Puffer		
Binding Puffer	6M Guanidin-HCl, 10mM Urea, 10mM Tris-HCl, 20% Triton X- 100	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Elutionspuffer	10mM Tris-HCl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Gelladepuffer	Blue Juice Gel Loading Buffer	invitrogen, Karlsruhe
Inhibitor Removal Puffer	5M Guanidin-HCl, 20mM Tris- HCl, 20ml Ethanol	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TAE-Puffer	ultra PURE 10xTAE	invitrogen, Karlsruhe

Waschpuffer	20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, 80ml Ethanol	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase freies Wasser	50ml	Qiagen

2.1.4. Kits

Tabelle 4: Kits

Aufreinigung zur Sequenzierung	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
DNA-Extraktion	High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Master-Mix Real-Time-PCR	TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

2.1.5. Primer und Sonden

2.1.5.1. 18S-Assay

Tabelle 5: Primer und Sonde, 18S-Assay

Primer/Sonde	Name	Sequenz 5'---3'	Anzahl Nukleotide
Forward Primer	ZM1 original	ATT ACC ATG AGC AAA TCA GA	20
	ZM1m	ATT ACC ATG AGC AAA TCA GAT A	22
	ZM1mo	TTA CCR TGA GCA AAT CAG ART G	22
Reverse Primer	ZM3 original	CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT AG	23
	ZM3m	CAA TCY AAG AAT TTC ACC TCT AG	23
	ZM3mod	AA TCY AAG AAT TTC ACC TCT AG CG	24
Sonde (LNA)	p-ZM	FAM-TYR R(G)G (G)B(A) T(T)T (G)T(A) TTT-BHQ1	18

2.1.5.2. 28S-Assay

Tabelle 6: Primer und Sonde, 28S-Assay

Primer/Sonde	Name	Sequenz 5'---3'	Anzahl Nukleotide
Forward Primer	WB28-1	TTG TTT GGG AAT GCA GCC T	19
	WB28-1m	TTT GGG AAT GCA GCC T	16
Reverse Primer	WB28-2	TCA RAG TTC TTT TCA WCT TTC CCT	24
TaqMAN-Sonde	p-WB28	FAM-CGA RAR ACC GAT AGC RAA CAA GTA CCG T-BHQ1	24

2.1.5.3. ITS2-Assay

Tabelle 7: Primer und Sonde, ITS2-Assay

Primer/Sonde	Name	Sequenz 5'---3'	Anzahl Nukleotide
Forward Primer	WB-ITS2-1	CGY ATC GAT GAA GAR CGY AGC A	22
	WB-ITS2-1m	GYA TCG ATG AAG ARC GYA GCA	21
	WB-ITS2-1mo	TCG ATG AAG ARC GYA GCA	18
Reverse Primer	WB-ITS2-2	GCC GTT ACT RRG GRA ATC MTT GTT A	25
	WB-ITS2-2m	CCG TTA CTR RGG RAA TCM TTG TTA	24
	WB-ITS2-2mo	CGT TAC TRR GGR AAT CMT TGT TA	23
TaqMAN- Sonde	p-WB-ITS2	FAM-TGA ACT TAA GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG AA-BHQ1	35
	p-WB-ITS2-m	FAM- TGA ACT TAA GCA TAT CAA TAA GCG GAG GA-TAMRA	29
	p-WB-ITS2-mo	FAM- AGC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA GAA-BHQ1	27

2.1.6. Untersuchungsmaterial

2.1.6.1. Stammissolate aus Würzburger Kulturen

Tabelle 8: Stammissolate aus Würzburger Kulturen

Code	Spezies
W1	<i>Cunninghamella species</i>
W2	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
W3	<i>Mucor circinelloides</i>
W4	<i>Mucor fragilis</i>
W5	<i>Mucor hiemalis</i>
W6	<i>Rhizomucor miehei</i>
W7	<i>Rhizomucor pusillus</i>
W8	<i>Rhizopus arrhizus/oryzae</i>
W9	<i>Rhizopus microsporus</i>

2.1.6.2. Stammissolate aus Baseler Kulturen

Tabelle 9: Stammissolate aus Baseler Kulturen

Code	Spezies
B1	<i>Cunninghamella bertholletia</i>
B2	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
B3	<i>Lichtheimia corymbifera</i>
B4	<i>Lichtheimia species</i>
B5	<i>Mucor hiemalis</i>
B6	<i>Mucor plumbeus/racemosus</i>

B7	<i>Rhizomucor pusillus</i>
B8	<i>Rhizopus arrhizus</i>
B9	<i>Rhizopus arrhizus</i>
B10	<i>Rhizopus microsporus</i>
B11	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
B12	<i>Syncephalastrum species</i>

2.1.6.3. Klinische Proben, Basel

2.1.6.3.1. Nativproben

Tabelle 10: Klinische Nativproben, Basel

Code	Spezies	Material
601871/09	<i>Rhizomucor pusillus/tauricus</i>	Lungenbiopsie
604897/09	<i>Rhizomucor pusillus/tauricus</i>	Lungenbiopsie
604898/09	<i>Rhizomucor pusillus/tauricus</i>	Lungenbiopsie
605170/09	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Biopsie
605637/09	<i>Aspergillus terreus</i>	Gewebe
606098/09	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Liquor
606957/09	<i>Candida albicans</i>	Lungenbiopsie
351405/10	<i>Absidia corymbifera</i>	Leberbiopsie
351408/10	<i>Absidia corymbifera</i>	Leberbiopsie
605016/10	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Lungenbiopsie

2.1.6.3.2. Formalin fixierte Proben

Tabelle 11: Formalin fixierte klinische Proben, Basel

Code	Spezies	Material
B06.15206 I (6)	<i>Aspergillus nidulans</i>	Lungenbiopsie
B09.7451 VII (26)	<i>Rhizopus microsporus</i>	Lungenbiopsie
B09.1094 (28)	<i>Alternaria species</i>	Hautbiopsie

2.1.6.4. Weitere *Mucorales*, AG Löffler, Uniklinik Würzburg

Tabelle 12: Weitere *Mucorales*, AG Löffler, Uniklinik Würzburg

Code	Spezies
Rhi H-1	<i>Rhizopus</i>
RM-1	<i>Rhizomucor</i>
Mu H-1	<i>Mucor fragilis</i>

2.1.6.5. *Non-Mucorales*, AG Löffler, Uniklinik Würzburg

Tabelle 13: *Non-Mucorales*, AG Löffler, Uniklinik Würzburg

Code	Spezies
V-10-2	<i>Aspergillus fumigatus</i>
V-128.3	<i>Candida krusei</i>
V-116.3	<i>Fusarium species</i>
V-128.5	<i>Alternaria alternata</i>
V-128.8	<i>Scedosporium species</i>
V-128-1	<i>Cryptococcus albidus</i>
V-128.7	<i>Penicillium chrysogenum</i>
VII 4.15	<i>Aspergillus flavus</i>
VI 02.9	<i>Aspergillus terreus</i>
VI 28.10	<i>Aspergillus niger</i>
VI 40.13	<i>Candida glabrata</i>
VI 40.14	<i>Candida tropicalis</i>
VI 28.4	<i>Candida parapsilosis</i>

2.1.6.6. Pilz-DNA aus beimpftem Tiergewebe, Innsbruck

2.1.6.6.1. Extrahierte DNA

Tabelle 14: Extrahierte DNA, Innsbruck

Herkunftsgewebe	Probennummer	Anzahl Proben
Lunge	4, 7, 10, 11, 16, 17, 19, 20, 21,31, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 45, 48, 49	22
Muskel	1, 2, 3, 5, 6, 9, 12, 13, 14, 18, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 39, 47, 50	21
ohne Zuordnung	8, 15, 23, 25, 33, 44, 46	7

2.1.6.6.2. Gewebeproben

Tabelle 15: Gewebeproben, Innsbruck, Charge 1

Gewebe	Innsbrucker Code	Würzburger Code
Lunge, 10°C	L 10°C	38, 41, 47, 55, 56, 59
Lunge, RT	L RT	33, 35, 44, 45, 50, 51
Muskel, 10°C	M 10°C	34, 36, 46, 48, 49, 57
Muskel, RT	M RT	37, 39, 42, 43, 53, 54

Tabelle 16: Gewebeproben, Innsbruck, Charge 2

Gewebe	Innsbrucker Code	Würzburger Code
Lunge, 18h	L Do1	62, 71, 74, 83
Lunge, 24h	L Do2	14, 17, 19, 20
Lunge, 48h	L FR	4, 13, 22, 27
Lunge, 5d	L Mo	7, 9, 23, 32
Muskel, 18h	M Do1	5, 12, 21, 31
Muskel, 24h	M Do2	3, 6, 26, 28
Muskel, 48h	M Fr	66, 69, 79, 84
Muskel, 5d	M Mo	73, 76, 80, 81

Tabelle 17: Gewebeproben, Innsbruck, Charge 3

Gewebe	Innsbrucker Code	Würzburger Code
Lunge, 4d	L 4T	67, 75, 77, 82
Lunge, 5d	L 5T	63, 68, 70, 78
Lunge, 7d	L 7T	61, 64, 65, 72
Muskel, 4d	M 4T	8, 10, 15, 25
Muskel, 5d	M 5T	1, 2, 11, 30
Muskel, 7d	M 7T	16, 18, 24, 29

Ohne Zuordnung: 40, 52, 58, 60

2.1.6.7. BAL-Proben

Tabelle 18: BAL-Proben

Anzahl Proben	Herkunft der Proben	<i>Aspergillus</i> positiv
96	Medizinische Klinik II der Universität Würzburg	15

2.1.6.8. Sonstige DNA

Tabelle 19: Sonstige DNA

DNA	Bezeichnung	Herkunft
<i>Bacillus cereus</i> -Sporen		AG Löffler, Uniklinik Würzburg
Humane DNA	18/12	AG Löffler, Uniklinik Würzburg
	20/12	AG Löffler, Uniklinik Würzburg
	21/12	AG Löffler, Uniklinik Würzburg
	40/12	AG Löffler, Uniklinik Würzburg
	42/12	AG Löffler, Uniklinik Würzburg
	44/12	AG Löffler, Uniklinik Würzburg

2.1.7. Fremdlabore und kooperierende Kliniken

Tabelle 20: Fremdlabore und kooperierende Kliniken

Herstellung der Oligonukleotide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sequenzierlabor	SEQLAB, Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen
Beratung bei ITS2-Modifizierung	Microsynth AG Schützenstrasse 15, Balgach, CH
Herkunft von 9 Stammissolaten	Institut für klinische Mikrobiologie der Uniklinik Würzburg
Herkunft von 12 Stammissolaten und 13 klinischen Proben	Abteilung Klinische Mikrobiologie, Universitätsspital Basel, CH
Herkunft der beimpften tierischen Proben	Sektion für Hygiene und Mikrobiologie der Medizinischen Universitätsklinik Innsbruck, CH

2.2. Methoden

2.2.1. Anmerkungen zum Untersuchungsmaterial

Während die Kulturen von den genannten Laboren nach Standardverfahren angezüchtet und bereits vorab durch Mikrobiologen identifiziert worden waren, stammten die klinischen Baseler Gewebeproben von Patienten, die nachweislich an einer Pilzinfektion erkrankt waren. Die DNA-Extrakte aus Innsbruck waren dort aus Gewebe von Schweinen gewonnen worden, welches mit verschiedenen Pilzsporen, u.a. von *Candida albicans* und verschiedenen *Mucorales*, gespickt worden war. In ähnlicher Weise wurde das tierische Lungen- und Muskelgewebe aus Innsbruck eigens mit *Mucorales*sporen beimpft und dem Labor PD Dr. Löffler zur Verfügung gestellt. Dies hatte sich als wichtiger Schritt in der Evaluierung der PCR-Methoden herauskristallisiert, da die Zahl tatsächlich an *Mucormykosen* erkrankter Patienten zu gering ist, um die klinische Anwendbarkeit der Assays zu verifizieren. Die BAL-Proben waren in den Jahren 2011 und 2012 im Rahmen der Routinediagnostik der Medizinischen Klinik II der Uniklinik Würzburg auf *Aspergillus* untersucht worden.

2.2.2. DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion sowohl aus den Würzburger und Baseler Kulturen, als auch aus den durch Innsbruck zur Verfügung gestellten tierischen Geweben, erfolgte unter Verwendung des High Pure PCR Template Preparation Kit. Der komplette Arbeitsgang wurde unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt, um eine etwaige Kontamination zu vermeiden.

Zunächst wurden mit einer Einmalöse ca. 0,5cm² des Pilzmyzels abgelöst und in die zuvor mit 2ml Aqua Purificata befüllten Falcons suspendiert. Im Fall der tierischen Gewebeproben wurde mit jeweils 300µl ebenso verfahren. Nachdem das Gemisch 5 Minuten bei 5000g zentrifugiert worden war, konnte der Überstand mit einer Pipette entfernt werden. Nach Zugabe der Ceramic Beads, wurde das Pellet aufgeratscht und anschließend für 3 Minuten gevortext. Im Anschluss daran wurden 200µl Binding Puffer, sowie 50µl Proteinase K zupipettiert. Nach 15 Minuten im 70°C warmen Wasserbad, während der die Probe alle 5 Minuten kräftig durchmischt wurde, konnten 100µl Isopropanol zugegeben werden, bevor nach erneuter Durchmischung das gesamte Volumen auf die Elutionssäulen aufgetragen wurde. Diese wurden dann 1 Minute bei 8000g zentrifugiert. Die nächsten Schritte umfassten der Reihe nach die Zugabe von 500µl Inhibitor Removal Puffer und zweimal 500µl Waschpuffer, wobei jeweils vor der Zugabe die Sammel tubes verworfen, durch neue ersetzt und die Probe erneut für 1 Minute bei 8000g zentrifugiert wurde. Schließlich wurde nach einer weiteren Zentrifugierung (2 Minuten bei 16000g) die Säule in das endgültige

Sammeltube gegeben und die DNA mit 100µl Elutionspuffer extrahiert. Abschließend wurde das Produkt nochmals für 1 Minute bei 8000g zentrifugiert.

Dieses relativ zeitaufwendige Extraktionsverfahren, das chemische, physikalische und mechanische Schritte kombiniert, wurde aufgrund der hohen Rigidität der Zellwand der *Zygomyceten* gewählt (Faggi, Pini et al. 2005).

2.2.3. DNA-Konzentrationsmessung

Die DNA-Konzentrationsmessung erfolgte photometrisch. Nachdem das Nano-Drop-Gerät zunächst mit Aqua Purificata auf den Nullwert eingestellt worden war, wurden 2µl des Eluats auf den Sensor pipettiert. Der gemessene Wert wurde in der Einheit ng/µl angezeigt. Da in der PCR nicht 1, sondern 5µl des Eluats zum Einsatz kamen, konnte durch Multiplikation mit dem Faktor 5 die DNA-Menge berechnet und schließlich in der Einheit fg/µl angegeben werden.

2.2.4. PCR

2.2.4.1. Prinzip der Real-time-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit kam als molekularbiologisches Nachweisverfahren der fungalen DNA die Polymerasekettenreaktion zum Einsatz, jedoch nicht in der konventionellen Form, die in der Regel noch die Durchführung einer Agarosegelelektrophorese zur Detektion des Amplifikats nach sich zieht, sondern als sogenannte Real-time-PCR.

Das Grundprinzip der PCR beruht auf der exponentiellen Vermehrung einer bestimmten Sequenz im Genom. Ausgangsprodukt ist ein doppelsträngiges Stück der zuvor extrahierten DNA, welches die gesuchte Sequenz enthält und als Matrize dient. Diese wird durch Hitzebehandlung in Einzelstränge aufgespalten (Denaturierung). In der folgenden Annealingphase hybridisieren definierte Primer, die die gesuchte Sequenz einrahmen und so einer Polymerase den zu amplifizierenden Bereich vorgeben. Diesen Amplifikationsvorgang bezeichnet man als Elongationsphase. Durch Wiederholung dieser 3 Schritte über bis zu 50 Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz.

Die Real-time-PCR bietet den Vorteil, dass durch die Verwendung einer sequenzspezifischen Sonde das Amplifikationsprodukt bereits während der PCR nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Dies wird durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht, die bei Anregung ein Lichtsignal emittieren, dessen Intensität im gleichen Maß zunimmt, wie die Menge der amplifizierten DNA.

In diesem Fall wurde in allen drei Assays eine sogenannte Taqman-Sonde verwendet, die das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers nutzt: Dabei handelt es sich um eine Sonde, die an beiden Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, einem sogenannten Reporter am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende. Der Reporter wird durch eine Lichtquelle definierter Wellenlänge angeregt und gibt die dabei freiwerdende Energie unmittelbar an den Quencher ab, das heißt, solange die Sonde intakt ist und sich die Fluorochrome in unmittelbarer Nachbarschaft befinden, wird nach außen nahezu kein Signal abgestrahlt; es wird gewissermaßen „gequenched“, also gelöscht. Während der Elongationsphase der PCR trifft nun jedoch die Sonde auf die Taq-Polymerase, die durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Sonde in ihre einzelnen Basen zerlegt. Dadurch findet eine räumliche Trennung von Reporter und Quencher statt, so dass das Fluoreszenzsignal nun nicht mehr unterdrückt, sondern emittiert und damit messbar wird. Da sich die Zahl der abgespaltenen Sonden-Moleküle proportional zum PCR-Produkt mit jedem Zyklus erhöht, steigt auch die Intensität des gemessenen Signals entsprechend (Lee, Connell et al. 1993).

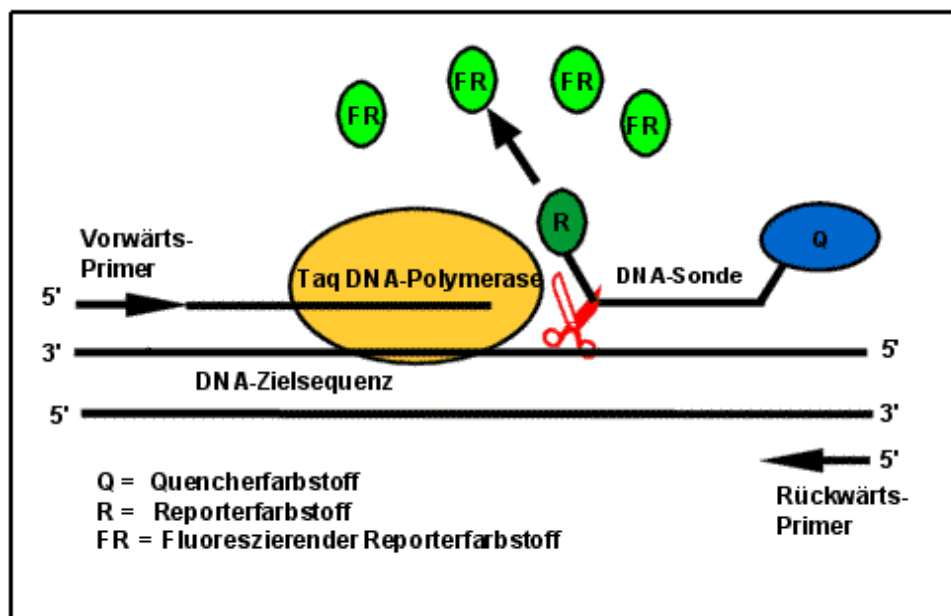


Abbildung 4: Prinzip der TaqMan-Real-time PCR

Das Fluoreszenzsignal wird in Form einer Kurve aufgezeichnet, die somit die Entstehung und Menge des PCR-Produkts abbildet. Dabei wird die Anzahl der Zyklen, die erforderlich sind, bis das Signal einen definierten Schwellenwert überschreitet, als sogenannter Ct-Wert (threshold cycle) bezeichnet. Dieser ist proportional zum Logarithmus der DNA-Template-Menge im Reaktionsansatz. Nach Überschreitung des Schwellenwertes beobachtet man eine Phase des exponentiellen Anstiegs, bis sich schließlich nach ca.35 bis 40 Zyklen eine Plateauphase einstellt. Diese beruht darauf,

dass durch den Verbrauch der PCR-Reagenzien keine signifikante Neusynthese mehr stattfinden kann und das Annealing durch die nun zahlreich vorhandenen Amplifikate gestört wird. Die Höhe des Plateaus spiegelt dabei die Effizienz der PCR wider. Nachdem die Ct-Werte durch die Systemsoftware gegen den Logarithmus einer standardisierten Verdünnungsreihe aufgetragen und als Gerade dargestellt werden, erfolgt schließlich durch Extrapolation der Standardkurve die Quantifizierung der Startkopienzahl.

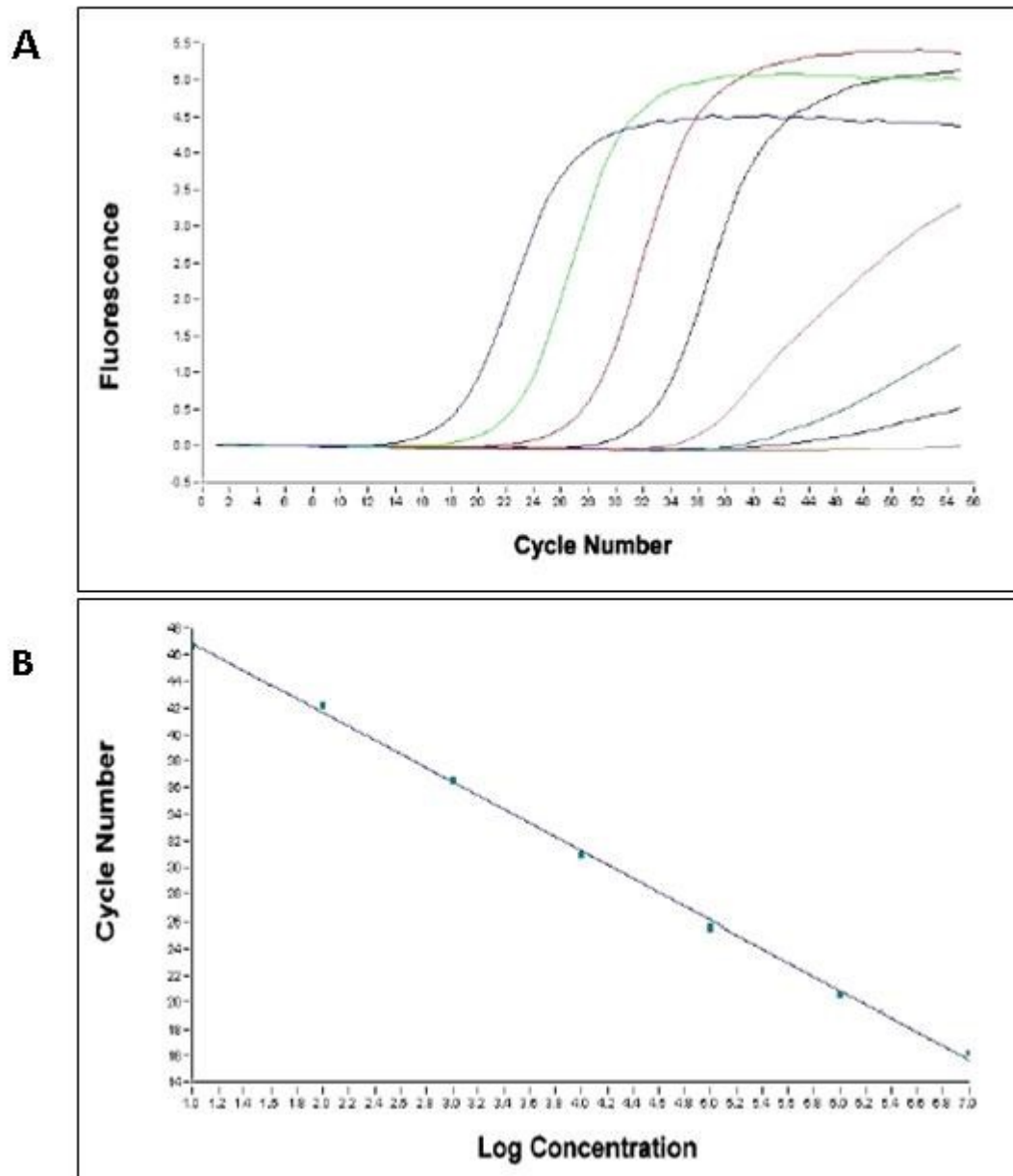


Abbildung 5: Amplifikationsprofil einer Real-time-PCR (A) und Standardkurve (B)
(<http://semj.sums.ac.ir/vol7/jul2006/pcr.htm>)

Eine weitere Besonderheit im Rahmen dieser Arbeit lag darin, dass im 18S-Assay, der ebenfalls als TaqMan-Real-time-PCR durchgeführt wurde, eine sogenannte LNA-Sonde zum Einsatz kam. LNA-Sonden (Locked-Nucleic-Acids) enthalten modifizierte Nukleotide, die eine festere Bindung an komplementäre Sequenzen zur Folge haben. Dadurch ist es möglich, mit einer höheren Annealingtemperatur zu arbeiten bzw. eine kürzere Sonde zu verwenden. Beides trägt zur Erhöhung der Spezifität bei (Busch, U. 2010).

2.2.4.2. PCR-Design

Auf Grundlage der im Anhang aufgeführten Referenzstämme wurde unter Verwendung eines Multiple Sequence Alignment (ClustalW2 EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) die für die 3 geplanten Assays optimalen Bereiche im ribosomalen Operon ermittelt. Im Anschluss daran erfolgte das Design der Primer und Sonden, wobei sich folgende Sequenzen als optimal erwiesen:

18S

Forward Primer: ZM1mo **TTA CCR TGA GCA AAT CAG ART G**

Reverse Primer: ZM3mod **AA TCY AAG AAT TTC ACC TCT AG CG**

TaqMan-Sonde (LNA): p-ZM **FAM-TYR R(G)G (G)B(A) T(T)T (G)TA TTT-BHQ1**

Dieses System beruht auf der bereits erwähnten Arbeit von Bialek (Bialek, Konrad et al. 2005). Die Original-Primer wurden vorab modifiziert (ZM1m und ZM3m anstelle von ZM1original und ZM3original; Sequenzen s. oben), mussten nach einer kurzen Testphase allerdings nochmals verändert werden, um dann in der Form ZM1mo und ZM3mod in optimaler Weise zur Anwendung zu kommen.

28S

Forward Primer: WB28-1 **TTG TTT GGG AAT GCA GCC**

Modifikation im Verlauf der PCR-Evaluierung:

WB28-1m **TTT GGG AAT GCA GCC T**

Reverse Primer: WB28-2 **TCA RAG TTC TTT TCA WCT TTC CCT**

TaqMan-Sonde: p-WB28 **FAM-CGA RAR ACC GAT AGC RAAS CAA GTA CCG T-BH**

ITS2

Da dieses System zunächst keine zufriedenstellenden Ergebnisse erbrachte (s. unten), wurden sowohl Primer als auch Sonde mehrfach modifiziert:

Forward Primer: WB-ITS2-1 **CGY ATC GAT GAA GAR CGY AGC A**
 WB-ITS2-1m **GYA TCG ATG AAG ARC GYA GCA**
 WB-ITS2-1mo **TCG ATG AAG ARC GYA GCA**

Reverse Primer: WB-ITS2-2 **GCC GTT ACT RRG GRA ATC MTT GTT A**
 WB-ITS2-2m **CCG TTA CTR RGG RAA TCM TTG TTA**
 WB-ITS2-2mo **CGT TAC TRR GGR AAT CMT TGT TA**

TaqMan-Sonde: p-WB-ITS2 **FAM-TGA ACT TAA GCA TAT CAA TAA GCG GAG**
 GAA AAG AA-BHQ1

 p-WB-ITS2-m **FAM- TGA ACT TAA GCA TAT CAA TAA GCG GAG**
 GA-TAMRA

 p-WBITS2-mo **FAM- AGC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA**
 GAA-BHQ1

Bei den Buchstaben B, R, W und Y handelt es sich um sogenannte degenerierte Basen, also die Mischung verschiedener Basen an einer Position:

B = CGT; R = AG; W = AT; Y = CT

2.2.4.3. PCR-Reaktionsansatz

Der Reaktionsansatz der PCR mit einem Gesamtvolumen von 25µl bestand in allen 3 Systemen aus 5µl extrahierter DNA und 20µl Reaktionsmix. Dieser war in den einzelnen Assays folgendermaßen zusammengesetzt:

18S und 28S

Tabelle 21: Reaktionsansatz der *Zygomyceten*-Real-time-PCR im18S- und 28S-System

Reagenzien	Volumina	Endkonzentration
Wasser Molekularbiologie	4,75µl	
TaqMan Master Mix	12,50µl	1x
Forward Primer	1,13µl	0,9µM
Reverse Primer	1,13µl	0,9µM
TaqMan-Sonde	0,50µl	0,9µM

Temperaturprofil:

- UNG-Aktivierung: 50°C für 2min
 - Initiale Denaturierung/
Aktivierung der Polymerase: 95°C für 10min
 - Denaturierung: 95°C für 15sec
 - Annealing und Elongation: 60°C für 60sec
- } 50 Zyklen

ITS2

Tabelle 22: Reaktionsansatz der *Zygomyceten*-Real-time-PCR im ITS2-System

Reagenzien	Volumina	Endkonzentration
Wasser Molekularbiologie	5,75µl	
TaqMan Master Mix	12,50µl	1x
Forward Primer	0,63µl	0,5µM
Reverse Primer	0,63µl	0,5µM
TaqMan-Sonde	0,50µl	0,2µM

Temperaturprofil:

- UNG-Aktivierung: 50°C für 2min
 - Initiale Denaturierung/Aktivierung der Polymerase: 95°C für 10min
 - Denaturierung: 95°C für 15sec
 - Annealing: 55°C für 30sec
 - Elongation: 72°C für 60sec
- } 50 Zyklen

Alle PCR-Läufe wurden im Step One Plus Real-Time-PCR-Gerät durchgeführt.

2.2.4.4. Etablierung und Evaluierung der PCR

Wie bereits im Abschnitt „Zielsetzung“ erläutert, lag die Intention dieses Projekts darin, Pilze der Gattung *Zygomyceten* sensitiv und spezifisch nachweisen zu können. Dafür wurden 3 verschiedene Bereiche des ribosomalen Pilzoperons als Zielstruktur gewählt:

- **18S-RNA-Gen:** Fragmentlänge ca. 180bp; Besonderheit: hohe Spezifität durch Amplifikation einer *zygomycetenspezifischen* Region
- **28S-RNA-Gen:** Fragmentlänge ca. 110bp; Besonderheit: hohe Sensitivität aufgrund der sehr kurzen Zielsequenz

- **ITS2-Genregion:** Fragmentlänge ca. 450bp; Besonderheit: Unterscheidung zwischen *Mucorales* und *Nonmucorales* UND Speziesdifferenzierung innerhalb der *Zygomyceten*

Die Etablierung und Evaluierung wurde in allen 3 Systemen nach einem bestimmten Schema vollzogen:

2.2.4.4.1. Etablierung und Überprüfung der Sensitivität unter Verwendung der Stammissolate

Bevor die 12 Baseler und 9 Würzburger Stammissolate, die die klinisch wichtigsten Unterarten der *Mucorales* repräsentieren, zum Einsatz kamen, wurde zunächst die grundsätzliche Anwendbarkeit der ausgewählten Primer und Sonden durch PCR-Läufe mit im Labor bereits bewährten *Zygomyceten*proben (*Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor fragilis*) ausgetestet und dabei möglichst optimale Cyclingbedingungen ermittelt. Die Stammissolate wurden in allen 3 Systemen sowohl in der Originalkonzentration, als auch in Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-12} mehrfach amplifiziert. Auf diese Weise war es möglich, die Nachweisgrenze der Assays zu bestimmen und über die Berechnung des unteren Detektionslimits in fg die Effizienz der PCR darzustellen. In gleicher Intention wurden die verdünnten Proben auch als Triplikate vervielfältigt.

2.2.4.4.2. Überprüfung der Spezifität

Um die Spezifität zu evaluieren, wurden die 3 PCR-Ansätze mit den oben aufgeführten *Nonmucorales* durchgeführt. Es sollte sichergestellt werden, dass bei einer späteren Anwendung im klinischen Bereich zuverlässig unterschieden werden kann zwischen Patienten mit einer *Zygomyceten*infektion und solchen mit beispielsweise der viel häufigeren *Aspergillose* (Hadaschik, Koschny et al. 2012), da diese Krankheitsbilder völlig unterschiedliche Therapieregime erfordern (Bohme, Ruhnke et al. 2009). Auch die bereits erwähnten Negativkontrollen mit humaner und *Bacillus*-DNA hatten den Zweck, die Spezifität der Amplifikation zu bestätigen.

2.2.4.4.3. Überprüfung der klinischen Anwendbarkeit

Da die 3 Assays in Zukunft auch den Klinikern der Universität Würzburg als Diagnostikum zur Verfügung stehen sollen, war die Überprüfung der klinischen Anwendbarkeit essentiell. Dies gestaltete sich insofern schwierig, als invasive *Zygomycosen* zwar eine steigende Inzidenz verzeichnen (Bhatti, Shaukat et al. 2006),

die absolute Zahl aber dennoch gering ist, so dass klinische Proben nur in sehr begrenzter Zahl zur Verfügung stehen. Daher wurde, nach Austestung der vorhandenen tatsächlichen klinischen Proben, auf DNA aus tierischem Gewebe ausgewichen, das mit *Zygomyceten*- und anderen Pilzsporen beimpft worden war, um

so eine reale Infektion möglichst optimal zu simulieren. Außerdem wurden das 18S- und ITS2-System an 96 BAL-Proben von Patienten überprüft, bei denen im Rahmen der klinischen Routinediagnostik eine *Aspergillus*-Infektion ausgeschlossen bzw. bestätigt worden war. Damit sollte zum einen nochmals gezeigt werden, dass die Assays spezifisch sind und kein Signal in den *Aspergillus*-positiven Proben ergeben. Zum anderen wurde vermutet, dass bei einigen der Patienten eine unerkannte Infektion/Kolonisierung mit *Zygomyceten* vorgelegen hatte, die nun im Nachhinein nachgewiesen werden sollte.

2.2.5. Gelelektrophorese

Die amplifizierte DNA kann mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden:

Zunächst wird 1g Agarose mit 5ml TAE Puffer in einem Messzylinder in der Mikrowelle erhitzt, bis sich ein schlierenfreies Gemisch gebildet hat. Nach Abkühlung setzt man 4µl Ethidiumbromid zu. Hierbei handelt es sich um einen in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der nach Anregung durch ultraviolettes Licht ein Fluoreszenzsignal abgibt. Anschließend wird das Gel in die Kammer gegossen und bis zum Erkalten ein Kamm eingesetzt, der die Taschen für die Proben freihält. Ist das Gel getrocknet, wird eine sogenannte DNA-Leiter (Ladder) in die erste Tasche aufgetragen. Diese enthält 12 DNA-Fragmente definierter Länge zwischen 100 und 1500bp, die im Verlauf der Elektrophorese ein leiterförmiges spezifisches Bandenmuster bilden und so genutzt werden können, um die Größe des Amplifikats abzuschätzen.

Im nächsten Schritt werden 10µl des Amplifikationsprodukts mit 2µl Ladepuffer (Blue Juice) versetzt und in die verbleibenden Taschen pipettiert.

Wird nun für 30 bis 45min eine elektrische Spannung von 120V angelegt, wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren der Probe im elektrischen Feld und trennen sich so der Größe nach auf. Die Laufstrecken können dann mit den Banden der Ladder verglichen werden, wodurch eine Abschätzung der Fragmentlänge möglich ist.

Abschließend wird das Ethidiumbromid durch UV-Licht angeregt und emittiert nun ein kräftiges Fluoreszenzsignal, dessen Stärke mit der DNA-Konzentration und damit der Fragmentlänge korreliert. Das Signal wird unter einem UV-Schirm dargestellt und mittels Kamera fotografisch gesichert.

Die Gelelektrophorese wurde zum einen durchgeführt, um den Erfolg der PCR durch ein zweites Verfahren zu validieren. Zum anderen war der Nachweis einer spezifischen Bande eine wichtige Voraussetzung für die Entscheidung, die Amplifikationsprodukte im nächsten Schritt sequenzieren zu lassen.

2.2.6. Sequenzierung

2.2.6.1. Prinzip und Durchführung der Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden mittels QIAquick® PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend an ein Fremdlabor (SEQLAB, Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Postfach 3343, 37023 Göttingen) versandt. Dort erfolgte die Sequenzierung unter Verwendung der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977):

Ein radioaktiver oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter, zur Amplifikatsequenz komplementärer DNA-Strang wird unter Verwendung sog. Didesoxynukleotide synthetisiert, wodurch es zu einem zufälligen Kettenabbruch und somit zu unterschiedlich langen DNA-Fragmenten kommt.

Ausgangspunkt der Neusynthese ist dabei der Forward- oder Reverse-Primer der zuvor durchgeführten PCR, der an die einzelsträngige DNA bindet. Nach Zugabe der 4 Desoxyribonucleotidtriphosphaten (dATP, dTTP, dCTP und dGTP), sowie jeweils eines Didesoxytriphosphats (ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP) stellt eine DNA-Polymerase in 4 parallelen Reaktionsansätzen einen komplementären Strang her, bis sie schließlich auf ein Didesoxytriphosphat trifft. Hier stoppt die Kettenverlängerung aufgrund der fehlenden 3`-OH-Gruppe des Nukleotids. Auf diese Weise erhält man ein Gemisch unterschiedlich langer DNA-Fragmente, an deren 3`-Ende sich stets eine bestimmte Base befindet – je nachdem, welches Didesoxynukleotid hinzugefügt worden war; z.B. führt ddATP dazu, dass die Moleküle mit Adenin enden.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente, werden diese mit Hilfe der radioaktiven Markierung oder des Fluoreszenzfarbstoffes, der für jedes Nukleotid in einer anderen Farbe aufleuchtet, sichtbar gemacht und die Sequenz anhand ihrer Länge ermittelt.

2.2.6.2. Sequenzierte Proben

Amplifikate wurden aus verschiedenen Gründen sequenziert:

Zum einen lag, wie bereits erläutert, der Zweck der ITS2-PCR per se darin, lange Fragmente zu erhalten, die für eine Sequenzierung optimal geeignet waren, um so die geplante Speziesidentifizierung durchführen zu können. Zum anderen ergaben sich im Verlauf der Versuche zum Teil unklare Resultate: mikrobiologisch als *Zygomyceten* deklarierte Proben konnten nicht amplifiziert werden, andere ausgewiesene *Non-Mucorales* zeigten ein Signal. Da die Identifizierung von Schimmelpilzen anhand der Kultur häufig Probleme mit sich bringt, insbesondere bei simultanen Infektionen durch verschiedene Erreger (Hofman, Dhouibi et al. 2010), und Differenzen zwischen der

konventionellen und der molekularbiologischen Diagnostik nicht selten vorkommen, konnten durch die Sequenzierung der Amplifikate Klarheit geschaffen werden. Außerdem wurden diejenigen Produkte der Innsbrucker Proben sequenziert, die im 18S-System positiv waren, um hier nochmals die Spezifität der PCR zu verifizieren und eine Speziesbestimmung vorzunehmen.

2.2.7. Kontrollen

2.2.7.1. Maßnahmen zur Qualitätssicherung und Kontaminationskontrolle

Gemäß den Qualitätsstandards in der mikrobiologischen Diagnostik der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie wurden die Arbeitsschritte Extraktion, Reaktionsmixansatz, Probenzugabe und Gelelektrophorese räumlich getrennt und mit stationären Arbeitsgeräten, sowie getrennten Pipettensätzen für DNA und übrige Reagenzien durchgeführt. Hierbei wurden die Verhaltensempfehlungen für das Arbeiten an Sicherheitswerkbänken beachtet und ausschließlich kommerziell abgepackte gestopfte Einmalpipettenspitzen eingesetzt. Die verwendeten Reagenzien wurden an einem reinen Arbeitsplatz in autoklavierte Eppendorfgeläße aliquotiert. Zudem fand die Lagerung DNA haltigen Materials in separaten Kühlschränken statt.

Um einer Kontamination der Arbeitsplätze entgegen zu wirken, wurden diese jeweils vor Durchführung der Arbeitsschritte für 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

Nachdem es in frühen Versuchen scheinbar zu einer Kontamination durch ubiquitär vorkommende *Zygomyceten* gekommen war, konnte diese durch die ausschließliche Verwendung RNase freien Wassers im Rahmen der weiteren PCR-Etablierung vermieden werden.

2.2.7.2. Extraktionskontrolle

Um sicherzustellen, dass es während des Extraktionsverfahrens nicht zu einer Kontamination gekommen war, wurden in jedem Durchgang pro 10 Proben 2 Extraktionskontrollen mitgeführt. Zu diesem Zweck wurden 2 Tubes mit 300µl Aqua Purificata anstelle des Pilzmaterials befüllt und in oben beschriebener Weise dem Extraktionsverfahren unterzogen. Die Eluate wurden in den anschließenden PCRs auf ihre Reinheit überprüft.

2.2.7.3. Positivkontrolle

Bei der Etablierung der PCR-Assays kam keine Positivkontrolle im klassischen Sinn, wie etwa ein kloniertes Plasmid mit Pilz-DNA, zum Einsatz. Stattdessen wurde bei der Amplifikation von Proben, die nicht zu den Stammsisolaten gehörten, stets ein solches,

gut etabliertes, mitgeführt, um die Sicherheit optimaler Reaktionsbedingungen zu haben.

2.2.7.4. Negativkontrolle

In jedem PCR-Lauf wurden Leerproben in Form von RNase freiem Wasser und/oder Elutionspuffer, die anstelle des Eluats in einer Menge von 5µl zupipettiert wurden, mitgeführt, um unspezifische Amplifikationen der Reaktionspartner und Kreuzkontaminationen ausschließen zu können.

In gleicher Intention wurden in einigen Durchgängen *Bacillus cereus*-Sporen und humane DNA als zusätzliche Negativkontrollen mitgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. DNA-Konzentration der Stammissolate

Nach Extraktion der DNA der Stammissolate B1 bis B12, sowie W1 bis W9 konnten mit dem Spectrometer folgende Konzentrationen ermittelt werden:

Tabelle 23: DNA-Konzentration der Stammissolate

Code	Species	DNA-Konzentration in ng/ μ l	DNA-Menge in ng/5 μ l
W1	<i>Cunninghamella species</i>	72,2	361
W2	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	23,3	116,5
W3	<i>Mucor circinelloides</i>	52,9	264,5
W4	<i>Mucor fragilis</i>	57,7	288,5
W5	<i>Mucor hiemalis</i>	32,7	163,5
W6	<i>Rhizomucor miehei</i>	34,7	173,5
W7	<i>Rhizomucor pusillus</i>	18,1	90,5
W8	<i>Rhizopus arrhizus/oryzae</i>	105,4	527
W9	<i>Rhizopus microsporus</i>	71	355
B1	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	104,1	520,5
B2	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	14,4	72
B3	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	38,9	194,5
B4	<i>Lichtheimia species</i>	31,7	158,5
B5	<i>Mucor hiemalis</i>	17,8	89
B6	<i>Mucor plumbeus/racemosus</i>	21,9	109,5
B7	<i>Rhizomucor pusillus</i>	64,2	321
B8	<i>Rhizopus arrhizus</i>	128,5	642,5
B9	<i>Rhizopus arrhizus</i>	68,3	341,5
B10	<i>Rhizopus microsporus</i>	46,7	233,5
B11	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	40,6	203
B12	<i>Syncephalastrum species</i>	21,1	105,5

Der stark differierende DNA-Gehalt der einzelnen Proben erklärt sich durch das Extraktionsverfahren, bei dem eine mit dem bloßen Auge abgeschätzte Menge des Kulturmaterials verarbeitet wurde. Legt man die ungefähre Größe des Genoms von *Aspergillus* mit ca. 33fg zugrunde (Brookman and Denning 2000; Baker 2006), kann die Extraktion als sehr effektiv beurteilt werden. Alle durchgeführten Extraktionskontrollen blieben negativ.

3.2. Amplifikation der Stammisolate

3.2.1. Amplifikation der Stammisolate im 18S- und 28S-System

Die Resultate im 18S- und 28S-System werden gemeinsam dargestellt, da sich aufgrund der ähnlichen Fragmentlänge eine Gegenüberstellung anbietet und die entsprechenden Versuche in der Regel in einem Lauf parallel durchgeführt wurden.

3.2.1.1. Verdünnung 10^{-1}

Um die generelle Amplifizierbarkeit der Stammisolate im 18S- und 28S-System nachzuweisen, wurden diese im Verhältnis 1:10 verdünnt und in die PCR eingesetzt. Im 18S-Assay konnte das initiale Resultat zum einen durch Veränderung der Cyclingbedingungen (Denaturierung bei 95°C für 15 statt 10sec, Annealing/Elongation bei 60°C für 60 statt 30sec), zum anderen durch den Einsatz des Reverse-Primers ZM3mod anstelle von ZM3, verbessert werden. Letzterer wurde von nun an in allen 18S-Läufen verwendet, nachdem er an einer Auswahl der Stammisolate erfolgreich getestet worden war.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Ct-Werte:

Tabelle 24: Ct-Werte 18S und 28S, Stammisolate, Verdünnung 10^{-1}

Isolat	Ct-Wert 18S, Cycling 1	Ct-Wert 18S, Cycling 2	Ct-Wert 18S, ZM3mod	Ct-Wert 28S
W1	negativ	25,28	23,90	19,96
W2	49,93	25,25	24,40	18,37
W3	29,93	18,30	17,64	14,03
W4	32,25	19,80		
W5	negativ	24,44		
W6	23,82	16,46	16,97	14,13
W7	31,30	15,84		
W8	31,73	19,03	17,98	13,55
W9	41,05	24,45		
B1	32,43			
B2	27,85			
B3	22,97	15,99		
B4	28,90	20,94		
B5	28,69	20,52		
B6	25,94	17,81		
B7	28,71	19,24		
B8	39,83	25,32		
B9	24,38	15,67		

B10	24,44	16,76		
B11	49,76	negativ		
B12	negativ	negativ	negativ	16,34

Das fehlende Signal im 18S-System bei B12 (*Syncephalastrum species*) kam höchstwahrscheinlich durch ein Mismatch der LNA-Sonde an Position 8 zustande; hier findet sich in der *Zygomycetense* Sequenz ein T statt des A der Sonde.

3.2.1.2. Verdünnungsreihen

3.2.1.2.1. Verdünnung 10^{-3}

Um die Sensitivität der PCR zu testen, wurden die Stammisolate mit Elutionspuffer auf die Konzentration 10^{-3} verdünnt. Dabei ergaben sich folgende Ct-Werte:

Tabelle 25: Ct-Werte 18S und 28S, Stammisolate, Verdünnung 10^{-3}

Isolat	Verdünnte Probe	Ct-Wert 18S	Ct-Wert 28S
W1	W1-3	26,55	25,37
W2	W2-3	27,44	24,43
W3	W3-3	negativ	20,39
W4	W4-3	24,93	21,67
W5	W5-3	28,05	24,11
W6	W6-3	23,76	21,01
W7	W7-3	20,60	21,20
W8	W8-3	22,61	19,74
W9	W9-3	27,43	23,47
B1	B1-3	26,08	24,94
B2	B2-3	26,44	26,36
B3	B3-3	23,91	20,38
B4	B4-3	26,27	22,87
B5	B5-3	25,04	21,84
B6	B6-3	23,91	20,93
B7	B7-3	22,22	22,64
B8	B8-3	22,13	19,33
B9	B9-3	22,40	19,12
B10	B10-3	23,92	20,47
B11	B11-3	27,27	20,38
B12	B12-3	negativ	22,29

Nachdem hier gute Resultate erzielt werden konnten, erfolgte im nächsten Schritt die Amplifikation in Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-12} .

3.2.1.2.2. Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-12}

Um die Sensitivität der 18S- und 28S-PCR weiter zu evaluieren, wurden in diesem Schritt neben den Ct-Werten die Nachweisgrenzen der Isolate B1, B3, B5, B7, B8 und die unteren Detektionslimits in fg ermittelt. Im Anschluss daran konnten mit Hilfe der StepOne Software die Steigung, der Korrelationskoeffizient und die Effizienz der PCR in Prozent berechnet werden. Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse, wobei die Ziffer nach der Isolatbezeichnung die Verdünnungsstufe angibt. So steht z.B. B1-1 für die Verdünnung 10^{-1} Probe B1.

Tabelle 26: Ct-Werte 18S und 28S, Stammisolate, Verdünnungsreihen

Isolat	Verdünnungsstufe	Ct-Wert 18S	Ct-Wert 28S
B1	B1-1	22,04	17,91
	B1-2	22,27	20,75
	B1-3	26,33	24,77
	B1-4	30,16	28,62
	B1-5	33,86	32,19
	B1-6	38,06	35,47
	B1-7	negativ	37,77
	B1-8	negativ	40,13
	B1-9	negativ	negativ
	B1-10	negativ	negativ
	B1-11	negativ	negativ
	B1-12	negativ	47,69
B3	B3-1	16,32	13,04
	B3-2	20,21	16,99
	B3-3	24,38	20,89
	B3-4	28,17	24,37
	B3-5	31,89	28,25
	B3-6	37,04	32,59
	B3-7	39,83	35,53
	B3-8	negativ	negativ
	B3-9	negativ	negativ
	B3-10	negativ	46,97
	B3-11	negativ	46,87
	B3-12	negativ	negativ
B5	B5-1	21,49	16,10
	B5-2	24,06	19,68
	B5-3	28,08	23,99
	B5-4	31,09	27,22
	B5-5	35,37	31,32
	B5-6	negativ	34,69
	B5-7	negativ	39,39

	B5-8	negativ	negativ
	B5-9	negativ	negativ
	B5-10	negativ	negativ
	B5-11	negativ	41,98
	B5-12	negativ	negativ
B6	B6-1	negativ	14,61
	B6-2	19,80	17,04
	B6-3	23,66	20,67
	B6-4	27,32	24,23
	B6-5	30,89	27,08
	B6-6	34,50	31,27
	B6-7	39,35	35,56
	B6-8	negativ	42,23
	B6-9	negativ	45,38
	B6-10	negativ	negativ
	B6-11	negativ	negativ
	B6-12	negativ	negativ
B7	B7-1	18,50	17,32
	B7-2	19,66	19,64
	B7-3	22,90	22,96
	B7-4	26,84	26,87
	B7-5	30,55	30,43
	B7-6	33,95	33,63
	B7-7	37,04	38,96
	B7-8	negativ	47,87
	B7-9	negativ	negativ
	B7-10	negativ	negativ
	B7-11	negativ	negativ
	B7-12	negativ	negativ
B8	B8-1	19,19	13,40
	B8-2	19,99	14,76
	B8-3	22,96	19,67
	B8-4	26,94	23,51
	B8-5	30,96	26,81
	B8-6	34,63	30,25
	B8-7	37,02	33,35
	B8-8	negativ	43,96
	B8-9	negativ	negativ
	B8-10	negativ	negativ
	B8-11	negativ	45,44
	B8-12	negativ	negativ
B10	B10-1	17,30	13,19
	B10-2	19,62	16,53
	B10-3	23,35	20,27

	B10-4	27,85	24,24
	B10-5	31,24	27,77
	B10-6	35,02	30,97
	B10-7	39,86	35,55
	B10-8	negativ	44,81
	B10-9	negativ	39,64
	B10-10	negativ	negativ
	B10-11	negativ	negativ
	B10-12	negativ	negativ
B11	B11-1	negativ	13,64
	B11-2	negativ	16,67
	B11-3	negativ	20,43
	B11-4	negativ	23,70
	B11-5	negativ	27,44
	B11-6	negativ	30,87
	B11-7	negativ	37,24
	B11-8	negativ	35,42
	B11-9	negativ	43,189
	B11-10	negativ	negativ
	B11-11	negativ	negativ
	B11-12	negativ	negativ
W4	W4-1	18,74	14,91
	W4-2	20,95	17,68
	W4-3	24,58	21,21
	W4-4	28,18	24,74
	W4-5	32,01	28,63
	W4-6	35,46	32,21
	W4-7	39,84	35,90
	W4-8	41,44	37,73
	W4-9	negativ	negativ
	W4-10	negativ	negativ
	W4-11	negativ	negativ
	W4-12	negativ	negativ

Hier konnte deutlich dargestellt werden, wie mit abnehmender DNA-Konzentration die Signale schwächer werden. Im 28S-System waren diese durchgehend stärker und konnten meist bis in höhere Verdünnungsstufen verfolgt werden. Allerdings zeigte sich in diesen, ebenso wie in 4 von 14 Negativkontrollen eine Kontamination der Proben (Elutionspuffer: Ct-Werte 41,94; 39,58; H₂O: Ct-Werte 44,93; 43,88). Um dies zu vermeiden, wurde in allen weiteren Läufen sowohl für die Herstellung des TaqMan-Master-Mix, als auch für die Negativkontrollen RNase freies Wasser verwendet.

Dadurch verringerte sich die Zahl falsch positiver Negativkontrollen, aber erst durch eine spätere Modifikation des Forward Primers (WB28-1m mit 16 Nukleotiden anstelle von WB28-1 mit 19 Nukleotiden) konnte das Problem endgültig beseitigt werden. Auffällig war auch, dass die Probe B11 im 18S-System nicht amplifiziert werden konnte; der Grund hierfür ist unbekannt.

Es ergaben sich folgende Nachweisgrenzen und untere Detektionslimits:

Tabelle 27: Nachweisgrenzen und untere Detektionslimits der Stammissolate, 18S und 28S

Isolat	PCR	Positiv bis...Verdünnungsstufe	Detektionslimit in fg
B1	18S	10 ⁻⁶	520
	28S	10 ⁻⁸	5,2
B3	18S	10 ⁻⁷	19,5
	28S	10 ⁻⁷	19,5
B5	18S	10 ⁻⁵	890
	28S	10 ⁻⁷	8,9
B6	18S	10 ⁻⁷	10,9
	28S	10 ⁻⁷	10,9
B7	18S	10 ⁻⁷	32
	28S	10 ⁻⁸	3,2
B8	18S	10 ⁻⁷	64
	28S	10 ⁻⁸	6,4
B10	18S	10 ⁻⁷	23,3
	28S	10 ⁻⁸	2,3
B11	18S	*	*
	28S	10 ⁻⁸	2,0
W4	18S	10 ⁻⁸	2,9
	28S	10 ⁻⁸	2,9

Dies zeigte wiederum, dass das 28S-System das sensitivere ist, jedoch beide Assays die Amplifikation von *Zygomyceten* zuverlässig ermöglichen. Die Probe B11 (*) konnte, wie bereits erwähnt, im 18S-System nicht amplifiziert werden.

Durch die StepOne-Software konnten für die Isolate B1, B3, B5, B7 und B8 folgende Werte berechnet werden, die wichtige Eckdaten für ein PCR-System darstellen:

- **Steigung (Slope):** Sie ist ein Maß der Effizienz. In einem optimalen System (100%ige Effizienz) läge sie bei -3,32.

- **Y-Intercept (Y-Inter):** Er ist ein Maß für die Abweichung von der Standardkurve und bezeichnet den Punkt, in dem eine durch die abweichenden Werte gelegte Regressionsgerade die y-Achse schneidet.
- **Korrelationskoeffizient (R2):** Er gibt die Korrelation mit der Standardkurve wider und liegt im optimalen Fall über 0,99.
- **Effizienz (Eff. %) der PCR-Systeme**

Tabelle 28: lineare Korrelation und Effizienz der 18S- und 28S-PCR, Stammisolate

Isolat	PCR	Slope	Y-Inter	R2	Eff. %
B1	18S	-3,913	22,211	1,0	80,11
	28S	-3,368	17,876	0,998	86,90
B3	18S	-4,074	16,431	0,998	75,98
	28S	-3,764	13,020	1,0	84,37
B5	18S	-3,479	21,059	0,994	93,82
	28S	-3,735	19,911	0,998	85,24
B7	18S	-3,625	19,528	0,999	88,75
	28S	-3,545	19,615	0,999	91,45
B8	18S	-3,888	19,160	1,0	80,80
	28S	-3,410	19,900	0,999	96,45

Das 28S-System zeigte eine durchgehend höhere Effizienz als das 18S-System, mit Ausnahme der Probe B5 (*Mucor hiemalis*), die in 18S besser amplifiziert werden konnte.

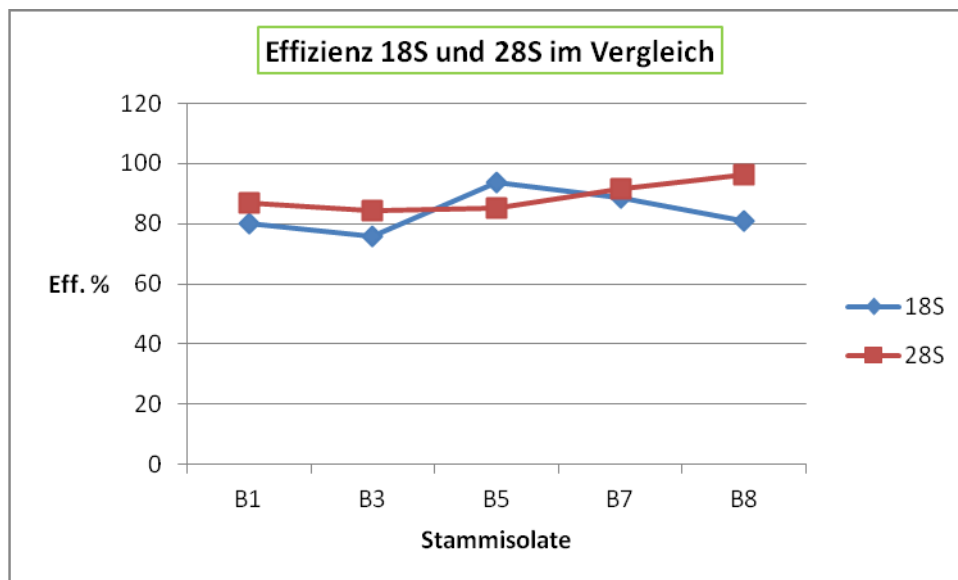


Abbildung 6: Effizienz des 18S- und 28S-Systems im Vergleich

3.2.1.2.3. Triplikat

Die Evaluierung der Sensitivität des 18S- und 28S-Systems wurde abgeschlossen, indem die Isolate B1, B3, B5, B7 und B8 in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-8} als Triplikat amplifiziert wurden.

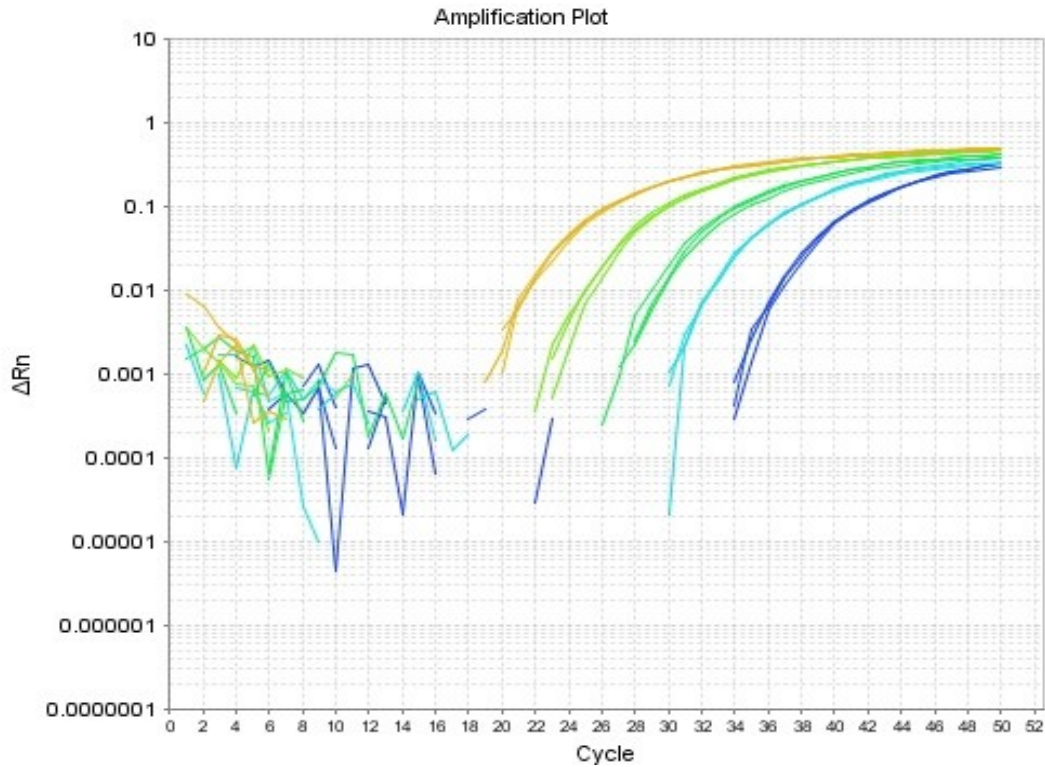


Abbildung 7: Beispiel einer Amplifikation von 5 Proben als Triplikat

Im Anschluss daran erfolgte wiederum die Bestimmung der oben aufgeführten Parameter:

Tabelle 29: Nachweisgrenzen und Sensitivitätsraten der Stammissolate, Triplikat, 18S und 28S

Isolat	PCR	Positiv bis...Verdünnungsstufe	Detektionslimit in fg
B1	18S	10^{-7} (2/3)	52
	28S	10^{-7} (2/3)	52
B3	18S	10^{-7} (2/3)	19,5
	28S	10^{-7} (3/3)	19,5
B5	18S	10^{-7} (1/3)	8,9
	28S	10^{-7} (2/3)	8,9
B7	18S	10^{-7} (3/3)	32
	28S	10^{-7} (2/3)	32
B8	18S	10^{-7} (3/3)	64
	28S	10^{-8} (3/3)	6,4

In Klammern angegeben ist jeweils, wie viele der Proben im Triplikate positiv waren. Es zeigte sich, dass durch den Einsatz als Triplikate keine signifikante Veränderung der Nachweisgrenzen und Sensitivitätsraten erzielt werden konnte, jedoch wiederum eine zuverlässige Amplifikation in beiden Systemen möglich war.

Tabelle 30: lineare Korrelation und Effizienz der 18S- und 28S-PCR, Stammsolate, Triplikate

Isolat	PCR	Slope	Y-Inter	R ²	Eff. %
B1	18S	-3,758	22,857	0,998	84,535
	28S	-3,575	23,557	0,998	90,423
B3	18S	-3,736	21,240	0,996	85,205
	28S	-3,498	19,738	0,998	93,153
B5	18S	-3,628	22,086	0,994	88,637
	28S	-3,503	21,804	0,998	92,947
B7	18S	-3,557	20,138	0,998	91,035
	28S	-3,483	21,726	0,998	93,705
B8	18S	-3,758	19,485	0,998	84,540
	28S	-3,611	18,225	0,998	89,195

Errechnet man in beiden Fällen den Mittelwert der Effizienz, so verzeichnet man im Triplikate eine Erhöhung um ca. 3% (18S: 83,9% vs. 86,8%; 28S: 88,9% vs. 91,9%).

3.2.2. Amplifikation der Stammsolate im ITS2-System

3.2.2.1. Initiale Etablierung

Die initiale Etablierung der ITS2-PCR bereitete Probleme, insofern als trotz mehrfacher Veränderung der Cyclingbedingungen keine oder unbefriedigende Signale resultierten. Dies hatte zur Folge, dass die Primer WB-ITS2-1 und WB-ITS2-2, sowie die Sonde p-WB-ITS2 durch WB-ITS2-1m, WB-ITS2-2m und p-WB-ITS2-m ersetzt wurden, wodurch eine etwas verbesserte Amplifikation erreicht werden konnte. Da diese aber immer noch nicht als zufriedenstellend gewertet werden konnte, wurden unter Beratung durch die Microsynth AG, Balgach die Oligonukleotide WB-ITS2-1mo, WB-ITS2-2mo und p-WB-ITS2-mo designed. Nach Austestung mit den vorherigen Primern und Sonden in verschiedenen Variationen, erwies sich die Kombination von WB-ITS2-1m, WB-ITS2-2m und p-WB-ITS2-mo am günstigsten und wurde in allen weiteren Durchgängen verwendet. In diesem Zusammenhang stellte sich außerdem heraus, dass bessere Ergebnisse erzielt werden konnten, wenn die Primer in einer Konzentration von 0,5 anstelle der ursprünglichen 0,9µM eingesetzt wurden.

3.2.2.2. Amplifikation in niedrigen Verdünnungsstufen

Alle Stammisolate wurden zunächst in niedrigen Verdünnungsstufen amplifiziert, um die grundsätzliche Anwendbarkeit des veränderten Designs im ITS2-System darzustellen. Dabei fand das Annealing anfangs bei 54°C statt, später wurden 55°C ausgetestet. Es ergaben sich die folgenden Ct-Werte:

Tabelle 31: Ct-Werte ITS2, Stammisolate, niedrige Verdünnungsstufen, 54°C und 55°C

Isolat	Verdünnungsstufe	Ct-Wert ITS2, 54°C	Ct-Wert ITS2, 55°C
B1	10 ⁻³	36,35	
B2	10 ⁻²		28,28
	10 ⁻³	33,17	33,09
B3	10 ⁻³	39,13	
B4	10 ⁻²		28,88
	10 ⁻³	32,96	33,71
B5	10 ⁻³	31,35	
B6	10 ⁻²		32,63
	10 ⁻³	35,33	37,43
B7	10 ⁻³	36,64	
B8	10 ⁻³	24,61	
B9	10 ⁻²		19,80
	10 ⁻³	24,90	23,92
B10	10 ⁻²		36,38
	10 ⁻³	38,99	42,50
B11	10 ⁻²		35,58
	10 ⁻³	negativ	39,96
B12	10 ⁻²		36,06
	10 ⁻³	40,39	40,68
W1	10 ⁻²		49,67
	10 ⁻³	negativ	negativ
	1:50		44,94
W2	10 ⁻²		32,41
	10 ⁻³	38,09	35,69
W3	10 ⁻²		28,38
	10 ⁻³	32,77	31,68
W4	10 ⁻²		30,30
	10 ⁻³	33,32	34,11
W5	10 ⁻²		35,27
	10 ⁻³	38,69	38,00
W6	10 ⁻²		27,55
	10 ⁻³	34,29	32,42
W7	10 ⁻²		30,48
	10 ⁻³	33,69	35,97

W8	10 ⁻²		20,68
	10 ⁻³	25,84	24,99
W9	10 ⁻²		40,52
	10 ⁻³	45,04	45,31

Nach den anfänglichen Schwierigkeiten war nun eine zuverlässige Amplifikation möglich, wobei keine der gewählten Annealingtemperaturen einen eindeutigen Vorteil erbrachte.

Diese Resultate hatten deshalb eine besondere Bedeutung, da das ITS2-System per primam intentionem zur Speziesdifferenzierung der verschiedenen *Mucorales* konzipiert worden war, und nun ausreichende Produkte für die später durchgeführte Sequenzierung zur Verfügung standen.

3.2.2.3. Amplifikation in mittleren Verdünnungsstufen

In einem weiteren Schritt wurden die Isolate B11, W1 und W9 in Verdünnungsstufen von 10⁻² bis 10⁻⁵ in die ITS2-PCR eingesetzt. Folgende Ct-Werte konnten gemessen werden:

Tabelle 32: Ct-Werte ITS2, Stammissolate, mittlere Verdünnungsstufen

Isolat	Verdünnungsstufe	Ct-Wert ITS2
B11	10 ⁻²	33,61
	10 ⁻³	38,27
	10 ⁻⁴	43,13
	10 ⁻⁵	negativ
W1	10 ⁻²	45,06
	10 ⁻³	negativ
	10 ⁻⁴	negativ
	10 ⁻⁵	negativ
W9	10 ⁻²	42,10
	10 ⁻³	46,93
	10 ⁻⁴	negativ
	10 ⁻⁵	negativ

Auffällig war, dass das Isolat W1 (*Cunninghamella species*) auch in diesem Lauf wieder schlecht zu amplifizieren war. Diese Probe hatte im 18S- und 28S-System nie Probleme bereitet. Ansonsten fiel bereits hier auf, dass das ITS2-System weniger sensitiv als 18S und 28S ist, was aber aufgrund der Fragmentlänge von 400 bis 500bp von vornherein zu erwarten war.

3.2.2.4. Amplifikation in hohen Verdünnungsstufen

Um auch im ITS2-Assay die Nachweisgrenzen und die unteren Detektionslimits zu ermitteln, wurde ein Teil der Stammisolate in Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-9} amplifiziert. Auf noch höhere Verdünnungen wurde, im Gegensatz zur 18S- und 28S-PCR verzichtet, da selbst in den 2 sensitiveren Systemen die Grenze bei max. 10^{-8} lag. Auch dieser Arbeitsschritt wurde zum Teil bei einer Annealingtemperatur von 54°C , zum Teil bei 55°C durchgeführt.

Die folgenden Tabellen zeigen die Ct-Werte, sowie die Nachweisgrenzen und die unteren Detektionslimits:

Tabelle 33: Ct-Werte ITS2, Stammisolate, hohe Verdünnungsstufen

Isolat	Verdünnungsstufe	Ct-Wert ITS2, 54°C	Ct-Wert ITS2, 55°C
B1	10^{-1}	33,20	
	10^{-2}	30,70	
	10^{-3}	35,83	
	10^{-4}	40,83	
	10^{-5}	45,30	
	10^{-6}	48,77	
	10^{-7}	negativ	
	10^{-8}	negativ	
	10^{-9}	negativ	
B3	10^{-1}	21,41	
	10^{-2}	28,54	
	10^{-3}	34,00	
	10^{-4}	38,42	
	10^{-5}	42,29	
	10^{-6}	44,35	
	10^{-7}	47,58	
	10^{-8}	negativ	
	10^{-9}	negativ	
B5	10^{-1}	32,75	
	10^{-2}	32,41	
	10^{-3}	34,40	
	10^{-4}	39,33	
	10^{-5}	43,77	
	10^{-6}	47,58	
	10^{-7}	48,28	
	10^{-8}	negativ	
	10^{-9}	negativ	
B6	10^{-4}		43,99
	10^{-5}		negativ

	10^{-6}		negativ
	10^{-7}		negativ
	10^{-8}		negativ
	10^{-9}		46,69
B7	10^{-1}	47,50	
	10^{-2}	33,68	
	10^{-3}	39,08	
	10^{-4}	42,36	
	10^{-5}	46,86	
	10^{-6}	negativ	
	10^{-7}	47,55	
	10^{-8}	negativ	
	10^{-9}	negativ	
B8	10^{-1}	20,41	
	10^{-2}	20,80	
	10^{-3}	25,84	
	10^{-4}	30,42	
	10^{-5}	negativ	
	10^{-6}	38,23	
	10^{-7}	41,16	
	10^{-8}	negativ	
	10^{-9}	negativ	
B10	10^{-4}		negativ
	10^{-5}		negativ
	10^{-6}		negativ
	10^{-7}		negativ
	10^{-8}		negativ
	10^{-9}		negativ
B11	10^{-4}		43,05
	10^{-5}		45,33
	10^{-6}		negativ
	10^{-7}		negativ
	10^{-8}		negativ
	10^{-9}		negativ
W4	10^{-4}		38,72
	10^{-5}		43,91
	10^{-6}		44,94
	10^{-7}		negativ
	10^{-8}		negativ
	10^{-9}		negativ

Die Resultate der Verdünnungen B6, 10^{-9} und B7, 10^{-7} wurden als Kontamination bzw. unspezifische Amplifikation und damit als negativ gewertet. Warum die Probe B8, 10^{-5}

kein Signal ergeben hatte, ist im Nachhinein nicht beurteilbar, die 2 folgenden Verdünnungen 10^{-6} und 10^{-7} wurden jedoch als positiv interpretiert.

Insgesamt wurde ab einem Ct-Wert von über 48 das Ergebnis als negativ gewertet.

Tabelle 34: Nachweisgrenzen und Sensitivitätsraten der Stammissolate, ITS2

Isolat	Positiv bis...Verdünnungsstufe	Detektionslimit in fg
B1	10^{-5}	5200
B3	10^{-7}	195
B5	10^{-6}	89
B6	10^{-4}	10900
B7	10^{-5}	3200
B8	10^{-7}	64
B10	10^{-3}	233000
B11	10^{-5}	2000
W4	10^{-6}	290

Zusammenfassend konnten auch im ITS2-System die Stammissolate zuverlässig amplifiziert werden, wobei sich die vorab erwartete niedrigere Sensitivität bestätigt hatte.

3.2.3. Sensitivität der 3 Systeme im Vergleich

Die Sensitivität der 3 PCR-Assays stellt sich im Vergleich folgendermaßen dar:

Tabelle 35: Nachweisgrenzen der Systeme im Vergleich

Isolat	PCR	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
B1	18S	+	+	+	+	-	-	-
	28S	+	+	+	+	+	+	-
	ITS2	+	+	+	-	-	-	-
B3	18S	+	+	+	+	+	-	-
	28S	+	+	+	+	+	-	-
	ITS2	+	+	+	+	+	-	-
B5	18S	+	+	+	-	-	-	-
	28S	+	+	+	+	+	-	-
	ITS2	+	+	+	+	-	-	-
B6	18S	+	+	+	+	+	-	-
	28S	+	+	+	+	+	-	-
	ITS2	+	+	-	-	-	-	-
B7	18S	+	+	+	+	+	-	-
	28S	+	+	+	+	+	+	-
	ITS2	+	+	+	-	-	-	-

B8	18S	+	+	+	+	+	-	-
	28S	+	+	+	+	+	+	-
	ITS2	+	+	+	+	+	-	-
B10	18S	+	+	+	+	+	-	-
	28S	+	+	+	+	+	+	-
	ITS2	+	-	-	-	-	-	-
W4	18S	+	+	+	+	+	+	-
	28S	+	+	+	+	+	+	-
	ITS2	+	+	+	+	-	-	-

Diese Tabelle zeigt, ebenso wie das folgende Diagramm, nochmals deutlich, dass das 28S-System bei weitem die größte Sensitivität aufweist, gefolgt von dem ebenfalls sehr sensitiven 18S-System. Aber obwohl der ITS2-Assay aufgrund der Fragmentlänge am schlechtesten abschneidet, waren die Unterschiede zu 18S dennoch nicht so signifikant, wie vielleicht zu erwarten gewesen wäre.

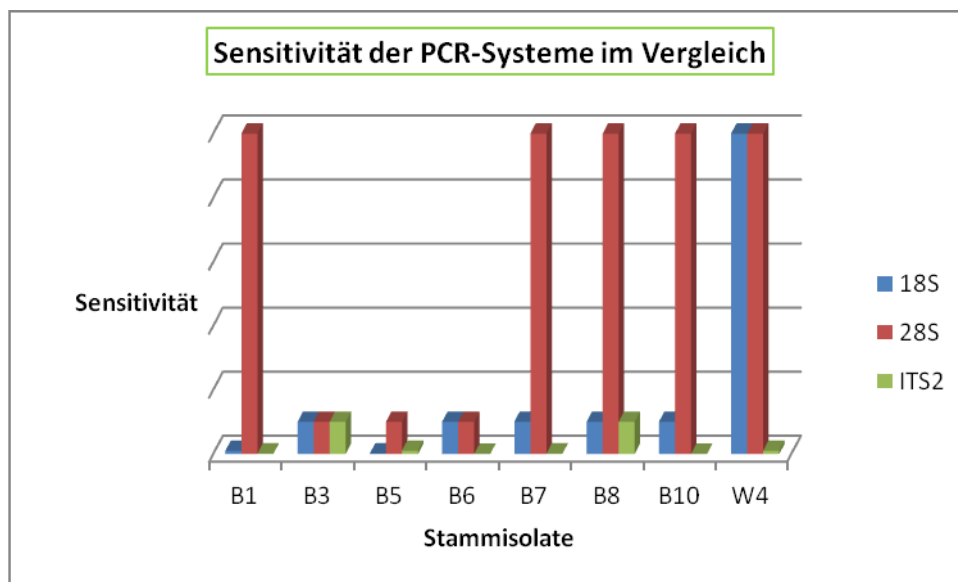


Abbildung 8: Sensitivität der PCR-Systeme im Vergleich

3.3. Gelelektrophorese Stammisolate

Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um das Ergebnis der Amplifikation der ITS2-PCR zu validieren. Außerdem war der Nachweis spezifischer Banden die Voraussetzung für die anschließend veranlasste Sequenzierung.

Die folgende Tabelle zeigt, welche Stammisolate auf das Agarosegel aufgetragen wurden und ob sich eine eindeutige Bande darstellen ließ:

Tabelle 36: Stammisolate, Gelelektrophorese

Isolat	Verdünnungsstufe	Spezifische Bande
B1	10^{-2}	++
	10^{-3}	+
	10^{-4}	+
B3	10^{-2}	++
	10^{-3}	+
	10^{-4}	+
	10^{-5}	+
	10^{-6}	-
B5	10^{-2}	+
	10^{-3}	+
	10^{-4}	+
	10^{-5}	(+)
B7	10^{-2}	+
	10^{-3}	+
B8	10^{-2}	++
	10^{-3}	+
	10^{-4}	+
	10^{-5}	+
	10^{-6}	(+)
	10^{-7}	(+)

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus dem Agarosegel, wobei links der Marker mit den definierten Fragmentlängen zu sehen ist:

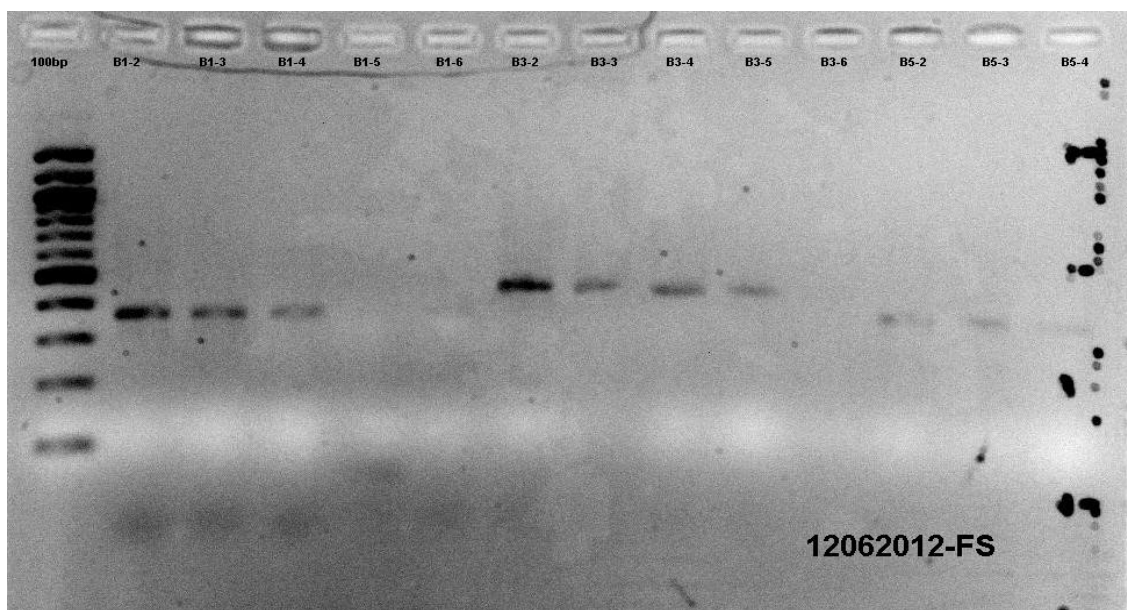


Abbildung 9: Agarosegel, Stammisolate

Es zeigten sich klare Banden der erwarteten Länge, sowie eine eindeutige Korrelation zwischen den zuvor ermittelten Ct-Werten und dem Signal auf dem Gel. Dieses war etwa bis zu einem Ct-Wert von 40 ablesbar.

3.4. Sequenzierung der Stammissolate

Da die ITS2-PCR nicht nur konzipiert worden war, um *Zygomyceten* sicher zu identifizieren, sondern vor allem auch, um deren verschiedene Spezies differenzieren zu können, schloss sich die Sequenzierung der ITS2-Amplifikate an. Als Sequenzierprimer wurde WB-ITS2-1m verwendet.

Die folgende Tabelle stellt die Ergebnisse der mikrobiologischen und molekularbiologischen Identifizierung gegenüber. Hierbei geben die Zahlen hinter dem Sequenzierergebnis an, wie viele Nukleotide des Amplifikats mit dem jeweiligen Referenzstamm der Genbank übereinstimmen, also z. B. 140 von 151.

Tabelle 37: Ergebnisse der ITS2-Sequenzierung

Isolat	Spezies	ITS2 Sequenzierung
B1	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	<i>Cunninghamella bertholletiae</i> 140/151
B2	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia corymbifera</i> 386/388
B3	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia ramosa</i> 379/379
B4	<i>Lichtheimia species</i>	<i>Lichtheimia ramosa</i> 329/331
B5	<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Mucor fragilis</i> 334/341
B6	<i>Mucor plumbeus/racemosus</i>	<i>Mucor racemosus</i> 349/352
B7	<i>Rhizomucor pusillus</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i> 260/364
B8	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i> 322/324
B9	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i> 331/333
B10	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i> 331/333
B11	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	<i>Syncephalastrum monosporum racemosum</i> 124/137
B12	<i>Syncephalastrum species</i>	<i>Syncephalastrum monosporum racemosum</i> 124/137
W1	<i>Cunninghamella species</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i> 332/334
W2	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia ramosa</i> 408/409
W3	<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Mucor circinelloides</i> 303/304
W4	<i>Mucor fragilis</i>	<i>Mucor fragilis</i> 348/351
W5	<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Mucor hiemalis</i> 296/298
W6	<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Mucor moelleri</i> 277/279
W7	<i>Rhizomucor pusillus</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i> 309/311
W8	<i>Rhizopus arrhizus/oryzae</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i> 348/351
W9	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus microsporus/ azygosporus</i> 307/313

Prozentual fand sich folgende Übereinstimmung/Abweichung:

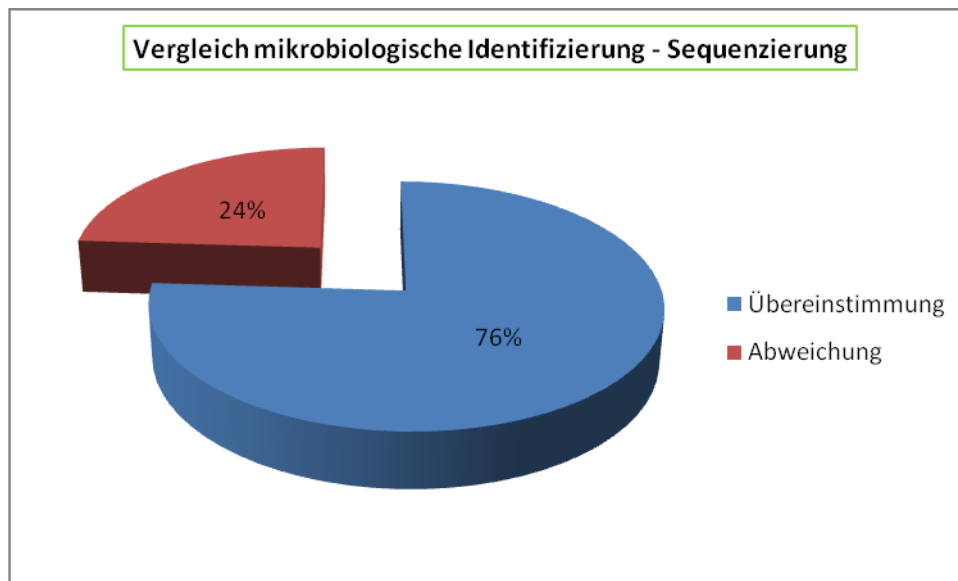


Abbildung 10: Vergleich mikrobiologische Identifizierung - Sequenzierung

3.5. Evaluierung der Spezifität

3.5.1. PCR mit *Non-Mucorales*

Um die Spezifität der *Zygomyceten*-PCR zu evaluieren, wurden 13 klinisch relevante *Non-Mucorales* in die 3 Systeme eingesetzt. Hierdurch sollte überprüft werden, ob die Assays tatsächlich nur *Zygomyceten*, oder auch andere Pilzarten amplifizieren. Da im 28S-System zunächst Signale bei *Non-Mucorales* auftraten, war dies ebenfalls ein Grund für den bereits erläuterten Primerwechsel (WB28-1m anstelle von WB28-1).

Folgende Ergebnisse konnten ermittelt werden:

Tabelle 38: Ct-Werte *Non-Mucorales*-PCR

Spezies	Ct-Wert 18S	Ct-Wert 28S alt	Ct-Wert 28S neu	Ct-Wert ITS2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	negativ	negativ		negativ
<i>Candida krusei</i>	negativ	45,73		negativ
<i>Fusarium species</i>	negativ	negativ		44,54
<i>Alternaria alternata</i>	23,56	20,16		37,40
<i>Scedosporium species</i>	negativ	negativ		negativ
<i>Cryptococcus albidus</i>	negativ	37,14		33,40
<i>Penicillium chrysogenum</i>	negativ	negativ		44,16
<i>Aspergillus flavus</i>	negativ	negativ	negativ	negativ

<i>Aspergillus terreus</i>	negativ	45,25	negativ	negativ
<i>Aspergillus niger</i>	negativ	31,18	negativ	negativ
<i>Candida glabrata</i>	negativ	32,87	negativ	44,89
<i>Candida tropicalis</i>	negativ	29,69	negativ	negativ
<i>Candida parapsilosis</i>	negativ	31,42	48,60	negativ

Da es auffällig war, dass die Proben *Alternaria alternata* und *Cryptococcus albidus* mit guten Ct-Werten in mehreren Systemen positiv waren, wurden diese nach gelelektrophoretischer Auftragung sequenziert. Während sich bei *Cryptococcus* nur eine unspezifische Sequenz ergab und somit keine Aufklärung möglich war, konnte die vermeintliche *Alternaria* als *Mucor circinelloides* identifiziert werden. Berücksichtigt man dies und interpretiert Ct-Werte über 48 als negativ, so ergibt sich folgende Spezifität:

- **18S:** 100%
- **28S alt:** 46,15%
- **28S neu:** 100%
- **ITS2:** 69,23%

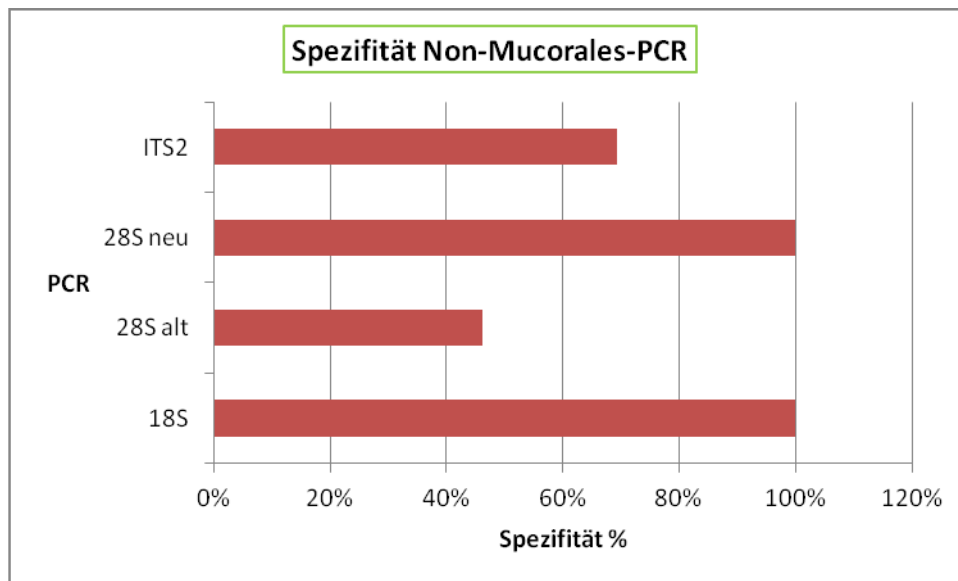


Abbildung 11: Spezifität der *Non-Mucorales*-PCR

3.5.2. PCR mit humaner und *Bacillus*-DNA

Zur weiteren Evaluierung der Spezifität wurde in die 3 PCR-Systeme 6 Proben humaner DNA sowie 2 mit *Bacillus cereus*-Sporen eingesetzt.

Hier zeigten sich weder in 18S und 28S, noch in der ITS2-PCR Signale. Diese Spezifität ist essentiell, wenn die Assay im klinischen Alltag zur Anwendung kommen sollen, wo eine unspezifische Amplifikation von Patienten-DNA sehr hinderlich wäre.

3.6. Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit

Da die Zahl invasiver *Mucormykosen* in den letzten Jahren deutlich zunimmt und im Uniklinikum Würzburg viele Patienten aus Risikokollektiven, wie etwa im Bereich der Hämatonkologie, versorgt werden, soll die *Zygomyceten*-PCR in Zukunft auch in der klinischen Routinediagnostik zur Verfügung stehen. Daher war es wichtig, die prinzipielle Anwendbarkeit bei klinischem Untersuchungsmaterial zu evaluieren.

3.6.1. PCR mit klinischen Proben aus Basel

3.6.1.1. Nativproben

Untersucht wurden 10 klinische Proben von Patienten, die nachweislich an einer Pilzinfektion erkrankt waren. Das Gewebe war überwiegend aus Lungen- und Leberbiopsien gewonnen worden. Die Spezieszuordnung wurde in Basel mit Hilfe einer panfungalen PCR durchgeführt und ergab in 5 Fällen *Zygomyceten*, 3x *Aspergillus*, sowie je 1x *Cryptococcus neoformans* und *Candida albicans*.

Die Isolate wurden in alle 3 PCR-Systeme eingesetzt, zum einen um die Nachweisbarkeit der *Zygomyceten* in klinischen Proben zu überprüfen; zum anderen konnte hier nochmals die Spezifität der Assays durch die Austestung von *Non-Mucorales*-Proben reevaluiert werden. Es ergaben sich folgende Resultate:

Tabelle 39: Ct-Werte klinische Nativproben, Basel

Isolat	Gewebe	Ct-Wert 18S	Ct-Wert 28S	Ct-Wert ITS2
<i>Rhizomucor pusillus</i> (1)	Lungenbiopsie	37,22	negativ	negativ
<i>Rhizomucor pusillus</i> (2)	Lungenbiopsie	35,56	33,74	47,04
<i>Rhizomucor pusillus</i> (3)	Lungenbiopsie	negativ	negativ	negativ
<i>Absidia corymbifera</i> (1)	Leberbiopsie	36,77	35,31	41,19
<i>Absidia corymbifera</i> (2)	Leberbiopsie	35,08	33,86	38,68

<i>Aspergillus fumigatus</i> (1)	Biopsie	negativ	negativ	47,57
<i>Aspergillus fumigatus</i> (2)	Lungenbiopsie	negativ	negativ	negativ
<i>Aspergillus terreus</i>	Gewebe	negativ	negativ	negativ
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Liquor	negativ	negativ	negativ
<i>Candida albicans</i>	Lungenbiopsie	negativ	negativ	negativ

Mit diesen Ergebnissen konnte nochmals bestätigt werden, dass mit den 3 Systemen ein sensitiver Nachweis von *Zygomyceten* möglich ist. Da die Probe *Rhizomucor pusillus* (1) allerdings weder in der 28S-, noch in der ITS2-PCR ein Signal gegeben hatte, weshalb Zweifel an der mikrobiologischen Identifizierung aufkamen, wurde das Produkt der 18S-PCR nach Durchführung einer Gelelektrophorese sequenziert. Hier zeigte sich, dass es sich bei diesem Isolat tatsächlich um *Rhizomucor pusillus /miehei* handelte, der hier nicht amplifiziert werden konnte.

Des Weiteren wurden die Amplifikate *Absidia corymbifera* (1) und (2), sowie *Rhizomucor pusillus* (2) der ITS2-PCR einer Sequenzierung unterzogen, um die Ergebnisse nochmals zu verifizieren. Während das Produkt von *Absidia* (1) nicht auswertbar war und es sich bei *Absidia* (2) tatsächlich um diese Spezies handelte, wurde *Rhizomucor pusillus* (2) als *Daucus carota* (Wilde Möhre) ausgewiesen – ein doch eher erstaunliches Ergebnis.

Hinsichtlich der nochmaligen Überprüfung der Spezifität der Systeme konnte es als Erfolg gewertet werden, dass keine der *Non-Mucorales* amplifiziert wurde.

3.6.1.2. Formalin fixierte Proben

Aus Basel standen auch 3 Formalin fixierte paraffinisierte Patientenproben zur Verfügung, die ebenfalls in allen PCR-Systemen ausgetestet wurden. Die folgende Tabelle gibt die Resultate wider:

Tabelle 40: Ct-Werte klinische Formalin fixierte Proben, Basel

Isolat	Gewebe	Ct-Wert 18S	Ct-Wert 28S	Ct-Wert ITS2
<i>Rhizopus microsporus</i>	Lungenbiopsie	42,91	27,15	negativ
<i>Aspergillus nidulans</i>	Lungenbiopsie	negativ	negativ	negativ
<i>Alternaria species</i>	Hautbiopsie	40,82	negativ	44,57

Auffällig war der Ct-Wert in der 28S-PCR, der deutlich niedriger lag, als bei den Nativproben. Dies erklärt sich dadurch, dass durch die Paraffineinbettung das Material stark strapaziert wird und es somit zur Fragmentierung der DNA kommt. PCR-Assays, die ein kurzes Fragment als Target haben, wie die 28S-PCR, ermöglichen hier einen sehr sensitiven Nachweis.

Die Probe *Rhizopus* konnte in der sich anschließenden Sequenzierung als *Rhizopus species* bestätigt werden. Zwar wurde das unerwünschte Amplifikat von *Alternaria* nicht weiter durch eine Sequenzierung überprüft, es ist jedoch anzumerken, dass diese Spezies bereits im Rahmen der *Non-Mucorales*-PCR als *Mucor* sequenziert wurde, so dass die Möglichkeit besteht, dass auch hier das Problem in der konventionellen mikrobiologischen Identifizierung lag.

3.6.2. PCR mit artifiziell infiziertem Gewebe aus Innsbruck

Aufgrund der geringen Anzahl klinischer Patientenproben wurde dieser Schritt durchgeführt, um eine Infektion mit *Zygomyceten* zu simulieren und so die klinische Anwendbarkeit weiter zu evaluieren.

3.6.2.1. PCR mit DNA-Extrakten

50 DNA-Extrakte aus Innsbruck, die dort aus Gewebe von Schweinen gewonnen und mit Pilzsporen, u.a. von *Candida albicans* und verschiedenen *Mucorales*, gespiked worden waren, wurden in die 18S- und 28S-PCR eingesetzt.

Die folgende Tabelle stellt die Ct-Werte der Proben, die mit 1 bis 50 durchnummeriert worden waren, dar. Alle nicht aufgeführten Extrakte hatten kein Signal gezeigt. Die Amplifikation wurde in diesem Fall über 55, anstelle von 50 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 41: Ct-Werte DNA-Extrakte, Innsbruck, 18S und 28S

Proben-Nr.	Gewebe	Ct-Wert 18S	Ct-Wert 28S
4	Lunge		46,16
6	Muskel		48,33
10	Lunge	53,46	
12	Muskel	36,00	35,46
13	Muskel	33,65	32,05
17	Lunge		50,96
18	Muskel		43,75
19	Lunge		40,75
20	Lunge		49,15
22	Muskel	36,79	35,76
25	ohne Zuordnung		49,24
27	Muskel	34,29	33,76

28	Muskel		39,92
30	Muskel	50,50	45,06
32	Lunge	46,42	46,13
35	Muskel	33,90	32,66
36	Lunge	45,60	
39	Muskel	33,63	33,58
40	Lunge	45,95	45,77
41	Lunge	43,97	43,42
44	ohne Zuordnung	53,55	45,52
45	Lunge		41,04
50	Muskel	45,72	

Demnach wurden in beiden Systemen große Übereinstimmungen gefunden, wobei im sensitiveren 28S-System erwartungsgemäß mehr Proben amplifiziert werden konnten. Positive Ergebnisse waren bei Lungen- und Muskelgewebe etwa gleich häufig (10 vs. 11).

18S: 14 positive Proben ► 28%

28S: 20 positive Proben ► 40%

Im Überblick verteilten sich die Proben folgendermaßen:

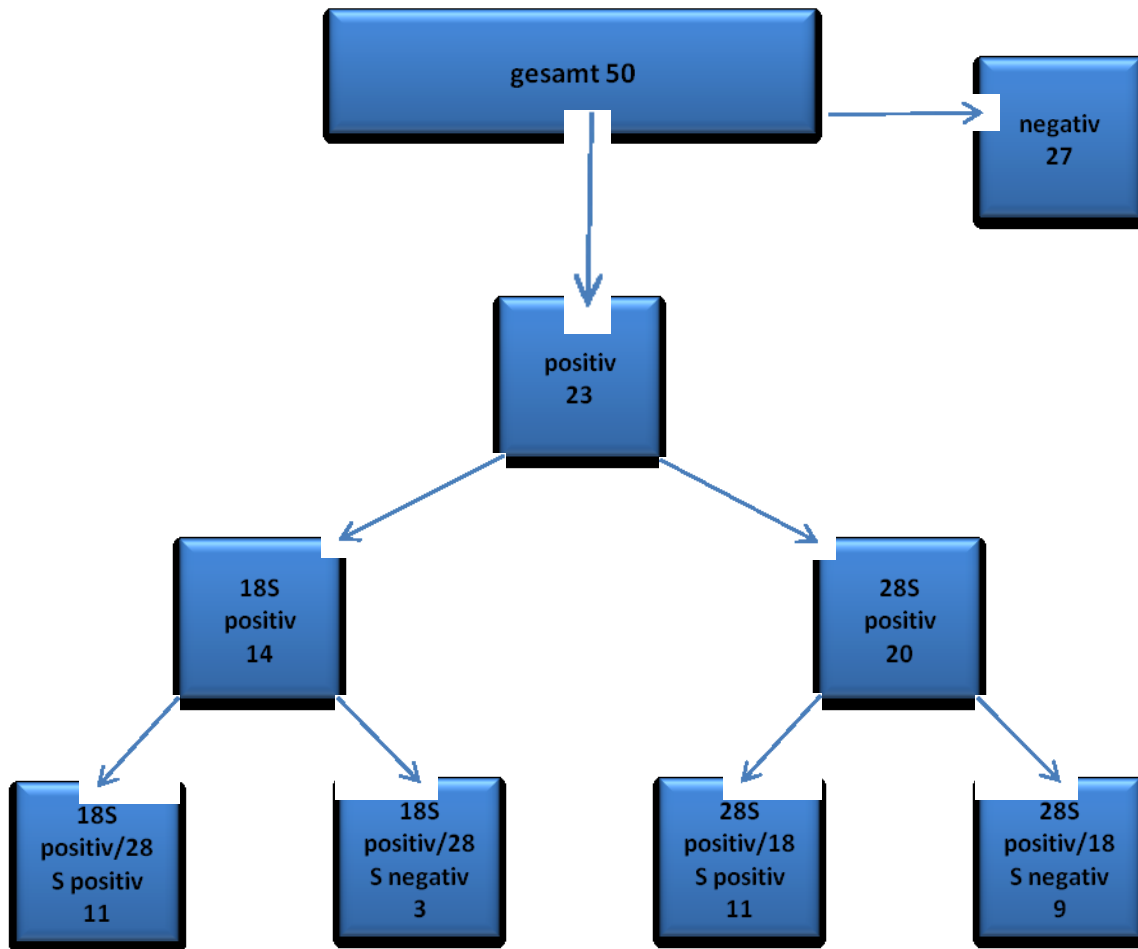


Abbildung 12: Verteilung der Ergebnisse, 18S- und 28S-PCR, Extrakte, Innsbruck

Die sich anschließende Sequenzierung der Amplifikationsprodukte des 18S-Systems ergab die folgenden Resultate. Auch hier geben die Zahlen hinter dem Sequenzierergebnis die Übereinstimmung der Basen des Amplifikats mit denjenigen der Referenzstämmen der Datenbank wieder.

Tabelle 42: Ergebnis der Sequenzierung der DNA-Extrakte, 18S, Innsbruck

Probennummer	Ergebnis der Sequenzierung
10	<i>Dichotomocladium species 122/133</i>
12	<i>Rhizopus species 121/128</i>
13	<i>Rhizopus species 133/135</i>
22	Gemisch
27	<i>Rhizopus species 90/91</i>
30	Gemisch
32	<i>Lichtheimia species 127/129</i>
35	<i>Rhizopus species 111/113</i>
36	<i>Rhizopus species 117/125</i>

39	<i>Rhizopus species 120/121</i>
40	Gemisch
41	Gemisch
44	Gemisch
50	Gemisch

Damit war zum einen bewiesen, dass das tierische Gewebe erfolgreich mit Pilzsporen beimpft worden war, zum anderen konnte die klinische Anwendbarkeit der PCR-Assays erneut bestätigt werden.

3.6.2.2. PCR mit beimpften Gewebeproben

Der nächste Schritt in der Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit bestand in der Austestung 84 tierischer Gewebeproben, die wiederum durch das Innsbrucker Labor mit verschiedenen Pilzsporen beimpft worden waren.

Die Beimpfung erfolgte in 3 Chargen, wobei sowohl Lungen-, als auch Muskelgewebe von Schweinen verwendet wurde. Die einzelnen Proben wurden dann bei verschiedenen Temperaturen bzw. über unterschiedliche Zeiträume inkubiert:

Charge 1

- Lungengewebe: 10°C; Raumtemperatur (RT)
- Muskelgewebe: 10°C; Raumtemperatur (RT)

Charge 2

- Lungengewebe: 18h; 24h; 48h; 5d
- Muskelgewebe: 18h; 24h; 48h; 5d

Charge 3

- Lungengewebe: 4d; 5d; 7d
- Muskelgewebe: 4d; 5d; 7d

4 Proben blieben ohne Chargenzuordnung.

Nachdem die DNA unter Verwendung des High Pure PCR Template Preparation Kit extrahiert worden war, wurden die Eluate unverdünnt in das 18S- und das 28S-System eingesetzt. Die Proben, die dort ein positives Signal ergeben hatten, wurden auch noch in der ITS2-PCR amplifiziert.

Folgende Ergebnisse konnten ermittelt werden:

Tabelle 43: Ct-Werte, Gewebeproben Innsbruck, 18S, 28S, ITS2

	Proben-Nr.	Ct-Wert 18S	Ct-Wert 28S	Ct-Wert ITS2
Charge 1				
Lunge, 10°C	38	negativ	negativ	
	41	negativ	negativ	
	47	49,31	negativ	negativ
	55	negativ	negativ	
	56	negativ	negativ	
	59	negativ	negativ	
Lunge, RT	33	negativ	negativ	
	35	negativ	negativ	
	44	negativ	negativ	
	45	negativ	negativ	
	50	negativ	negativ	
	51	negativ	negativ	
Muskel, 10°C	34	negativ	negativ	
	36	negativ	negativ	
	46	44,96	37,83	negativ
	48	negativ	negativ	
	49	negativ	47,78	negativ
	57	48,89	46,30	negativ
Muskel, RT	37	negativ	negativ	
	39	negativ	47,46	negativ
	42	negativ	45,70	negativ
	43	negativ	negativ	
	53	negativ	negativ	
	54	negativ	41,44	negativ
Charge 2				
Lunge, 18h	62	negativ	40,93	40,71
	71	negativ	46,38	negativ
	74	negativ	negativ	
	83	negativ	39,77	negativ
Lunge, 24h	14	negativ	negativ	
	17	43,36	35,43	43,75
	19	negativ	40,55	negativ
	20	negativ	42,00	negativ
Lunge, 48h	4	negativ	negativ	
	13	negativ	negativ	
	22	negativ	negativ	
	27	negativ	negativ	
Lunge, 5d	7	negativ	negativ	
	9	negativ	negativ	
	23	negativ	negativ	

	32	negativ	46,08	45,50
Muskel, 18h	5	negativ	negativ	
	12	negativ	negativ	
	21	negativ	negativ	
	31	negativ	negativ	
Muskel, 24h	3	negativ	negativ	
	6	negativ	negativ	
	26	negativ	negativ	
	28	negativ	negativ	
Muskel, 48h	66	negativ	44,01	negativ
	69	negativ	negativ	
	79	negativ	negativ	
	84		negativ	
Muskel, 5d	73	negativ	negativ	
	76	negativ	negativ	
	80	negativ	negativ	
	81	negativ	negativ	
Charge3				
Lunge, 4d	67	43,29	39,93	41,00
	75	negativ	negativ	
	77	48,01	42,40	39,17
	82	negativ	42,58	negativ
Lunge, 5d	63	negativ	45,89	negativ
	68	negativ	negativ	
	70	negativ	42,36	39,44
	78	negativ	negativ	
Lunge, 7d	61	negativ	negativ	
	64	45,29	37,18	negativ
	65	43,62	36,98	negativ
	72	46,92	38,16	41,29
Muskel, 4d	8	negativ	negativ	
	10	negativ	45,52	negativ
	15	negativ	negativ	
	25	negativ	negativ	
Muskel,5d	1	negativ	negativ	
	2	negativ	negativ	
	11	negativ	negativ	
	30	negativ	41,74	negativ
Muskel, 7d	16	negativ	negativ	
	18	negativ	46,02	negativ
	24	negativ	negativ	
	29	negativ	negativ	
Ohne Zuordnung	40	negativ	negativ	
	52	negativ	negativ	

	58	negativ	negativ	
	60	negativ	negativ	

Damit waren positiv in

18S: 9 Proben ► 10,7%

28S: 26 Proben ► 30,9%

ITS2: 7 Proben ► 8,3%

Stellt man die Anzahl der positiven Proben in den verschiedenen PCRs einander gegenüber, ergibt sich folgendes Bild:

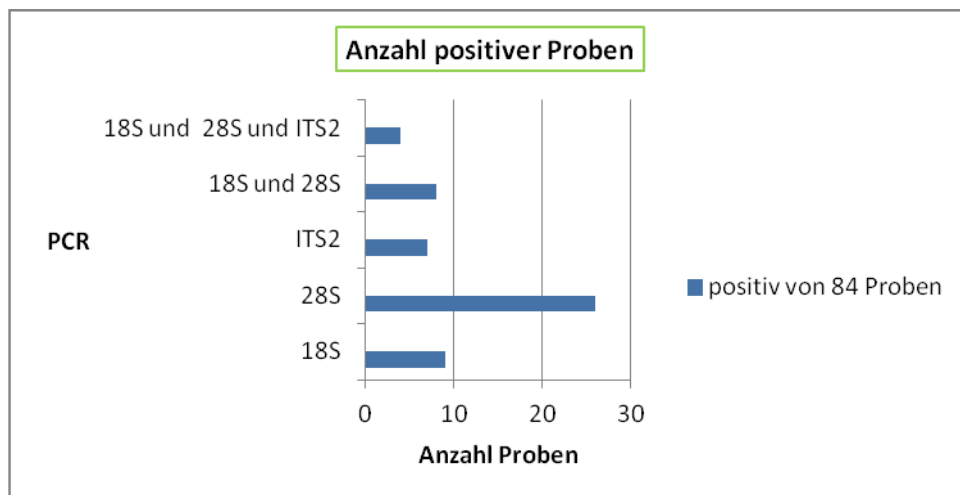


Abbildung 13: Anzahl der positiven Proben pro System im Vergleich, Gewebe, Innsbruck

Auch hier fand sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Systemen, wobei die sensitive 28S-PCR erneut die meisten Signale lieferte. In jedem Fall konnte auch in diesem Versuch die klinische Anwendbarkeit validiert werden.

Die Frage, ob es Extrakte eines Gewebetyps und/oder eines Inkubationszeitraums gab, die besonders effektiv amplifiziert werden konnten, soll folgendes Diagramm beantworten:

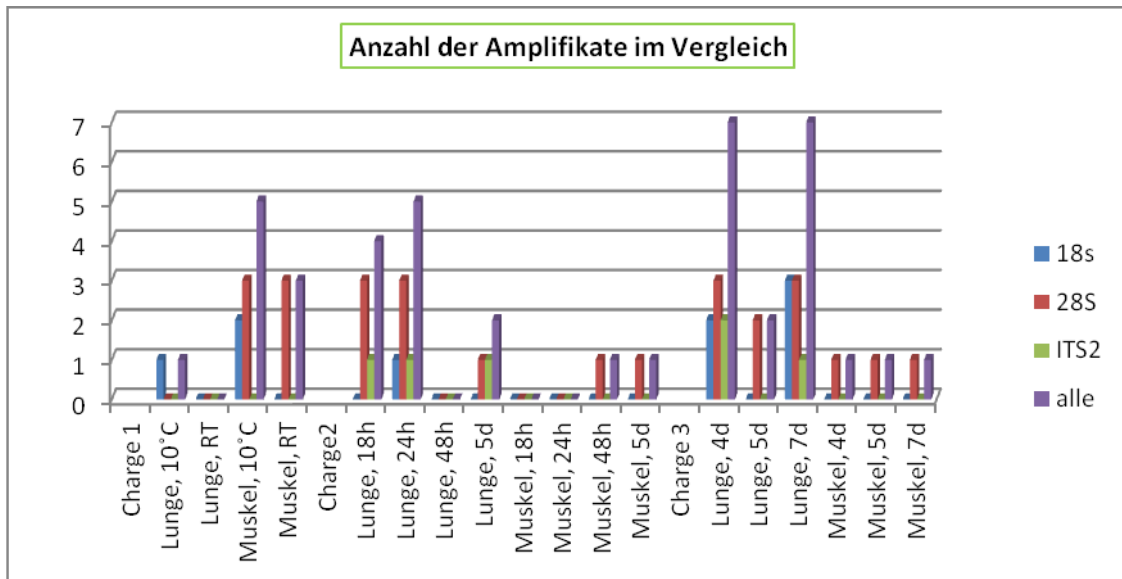


Abbildung 14: Vergleich der Amplifikatzahlen anhand des Gewebetyps

Obwohl sich hier ein recht gemischtes Bild zeigt, wird doch eindeutig klar, dass aus Lungengewebe häufiger Amplifikate gewonnen werden konnten. Hinsichtlich der Inkubationszeit schien es keine eindeutige Tendenz zu geben, da sowohl kurz (z.B. Lunge, 24h), als auch lang inkubierte Proben (z.B. Lunge, 7d) gute Resultate lieferten.

Dieser Teil der Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit wurde mit der Sequenzierung der Produkte der 18S-PCR unter Verwendung des Primers ZM3-mod. abgeschlossen. Sie lieferte folgende Ergebnisse:

Tabelle 44: Ergebnis der Sequenzierung der Gewebeproben, Innsbruck, 18S

Probennummer	Ergebnis der Sequenzierung
46	nicht auswertbar
47	<i>Rhizopus species</i> 114/116
57	nicht auswertbar
64	nicht auswertbar
65	<i>Rhizopus species</i> 127/128
67	<i>Rhizopus species</i> 103/106
72	nicht auswertbar
77	<i>Rhizopus species</i> 111/115
17	<i>Rhizopus species</i> 124/128

Obwohl nur die Hälfte der Proben ein verwertbares Ergebnis erbrachte, war dennoch erneut bestätigt worden, dass die PCR *Zygomyceten* spezifisch nachweist – auch in vermeintlich klinischem Untersuchungsmaterial.

3.6.3. PCR mit klinischen BAL-Proben

Zum Abschluss der Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit wurden das 18S- und das ITS2-System an 96 klinischen BAL-Proben durchgeführt. Diese stammten von Patienten der Medizinischen Klinik II der Universität Würzburg, wo sie im Rahmen der Routinediagnostik auf *Aspergillus* getestet worden waren. In 15 der 96 Proben konnte dieser Erreger zuvor tatsächlich nachgewiesen werden.

Hier ging es nun zum einen darum, zu zeigen, dass die Assays so spezifisch sind, dass die *Aspergillus*-positiven Proben kein Signal geben würden. Zum anderen wurde vermutet, dass aufgrund der steigenden Inzidenz von *Zygomycosen* einige Patienten eine unerkannte (Zweit-)Infektion mit *Mucorales* gehabt hatten, die man nun im Nachhinein diagnostizieren könnte.

Tatsächlich blieben aber mit einer Ausnahme alle 96 Proben negativ – sowohl in 18S, als auch in ITS2. Das positive, zuvor *Aspergillus* negative, Exemplar hatte mit einem Ct-Wert von 47,521 nur ein schwaches Signal gegeben, wurde aber dennoch einer Gelelektrophorese unterzogen und anschließend sequenziert, wobei sich herausstellte, dass es sich lediglich um eine Kontamination gehandelt hatte.

4. Diskussion

4.1. DNA-Extraktion

Die effektive Extraktion der DNA stellt eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen der PCR dar. Ein ideales Extraktionsprotokoll führt, ohne die Reinheit und Qualität der DNA in Mitleidenschaft zu ziehen, zu einem maximalen Gewinn genetischen Materials (Karakousis, Tan et al. 2006). Allerdings liegt dieses, gerade in Gewebebiopsien, oft in sehr begrenzter Menge vor.

Im Gegensatz zur Zellmembran der Säugetiere, die aus einer Doppellipidschicht und Transmembranproteinen besteht und durch Enzyme wie Proteinase K und Detergentien einfach zu lysieren ist (Ebeling, Hennrich et al. 1974), besitzen Pilze eine hochkomplexe Zellwand aus mehrfachen Schichten von Chitin, (1-3)- β -D-Glucan, (1-6)- β -Glucan, Lipiden und Peptiden. Fakultativ zeigt sich ein fester Überzug aus Melanin, der hochresistent gegenüber UV-Licht, enzymatischem Verdau und Chemikalien ist (Karakousis, Tan et al. 2006). Aufgrund dieser physikalischen Eigenschaften gibt es für Pilz-DNA keine einheitliche Extraktionsmethode (Selitrennikoff 2001; Chen, Halliday et al. 2002; Yeo and Wong 2002), sondern jede Pilzart erfordert eine eigene Methode, um die DNA effizient zu extrahieren (Manian, Sreenivasaprasad et al. 2001). Sicher ist nur, dass die rigide fungale Zellwand die Kombination verschiedener Verfahren (chemisch, physikalisch, mechanisch) notwendig macht. Dementsprechend findet sich in der Literatur eine Vielzahl vorgeschlagener Möglichkeiten (Fredricks, Smith et al. 2005), die dem Untersucher die adäquate Auswahl nicht einfach machen.

Das hier verwendete Protokoll kombiniert die chemischen und physikalischen Schritte des kommerziell erhältlichen High Pure PCR Template Preparation Kits mit dem mechanischen Zellaufschluss durch Keramikkügelchen. Vergleicht man die gewonnenen DNA-Mengen mit anderen Verfahren (Fredricks, Smith et al. 2005), konnte mit ca. 14 bis 128 ng/ μ l effektiv genetisches Material der *Zygomyceten* extrahiert werden. Allerdings war das Verfahren mit einem relativ großen Zeitaufwand verbunden, was durch den Einsatz automatischer Extraktionsverfahren zu verbessern wäre (Loeffler, Schmidt et al. 2002).

Die Sensitivität reduziert sich deutlich, wenn es im Rahmen der DNA-Extraktion zur Kontamination des Untersuchungsmaterials kommt. Diese ist zum einen möglich durch Inokulation von Sporen ubiquitär vorhandener Schimmelpilze (Buzina, Braun et al. 2003) aus der Luft, aber auch bei der Aliquotierung des Untersuchungsmaterials (Reiss, Obayashi et al. 2000) kann es unbemerkt zur Verunreinigung kommen. Weiterhin wurden Fälle beschrieben, in denen die Extraktionsreagenzien selber kontaminiert waren (Loeffler, Hebart et al. 1999).

Um diese Risiken zu minimieren, fand die Extraktion in einem separaten Raum unter einer Sicherheitswerkbank statt, wobei Geräte und Material ausschließlich für diesen Schritt verwendet wurden. Die Reinheit wurde durch mitgeführte Extraktionskontrollen überprüft. Diese blieben alle negativ.

4.2. Allgemeine Probleme der *Zygomyceten*-PCR

Ähnlich wie bei der Extraktion des genetischen Materials, liegt das größte Problem im Einsatz der PCR zum Nachweis von Pilz-DNA in der ubiquitären Verbreitung von Schimmelpilzen und dem daraus resultierenden hohen Kontaminationsrisiko (Khot, Ko et al. 2009). Darüber hinaus besteht in jedem Amplifikationsverfahren die Gefahr einer sog. Carryover-Kontamination, worunter die Amplifikation unerwünschter Produkte zu verstehen ist (Kwok and Higuchi 1989), die dann zu falsch positiven Ergebnissen führt. Diese treten insbesondere bei einer Nested-PCR auf, in der die Probengefäße zur Zugabe des zweiten, inneren Primers nochmals geöffnet werden müssen (Apfalter, Reischl et al. 2005), was ein Grund dafür war, dieses Verfahren gerade in der hoch anfälligen *Zygomyceten*-PCR nicht zu wählen.

Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass durch die Einhaltung entsprechender Vorsichtsmaßnahmen das Kontaminationsrisiko in Pilz-PCRs nicht höher ist, als in anderen (Loeffler, Hebart et al. 1999). Darunter fallen die unter 2.2.7.1. aufgeführten Vorkehrungen, ebenso wie eine saubere Arbeitsweise mit häufigem Handschuhwechsel (Kwok and Higuchi 1989) und die Begrenzung der Zahl der Positivkontrollen, die ebenfalls die Quelle einer Kontamination sein können (Apfalter, Reischl et al. 2005).

Doch obwohl die genannten Vorgehensweisen strikt eingehalten wurden, kam es dennoch im 28S-System zur Amplifikation unspezifischer Produkte, die auf eine Kontamination zurückgeführt wurde. Erst durch den Einsatz des modifizierten Primers WB28-1m und Verwendung RNase-freien Wassers konnte dieses Problem behoben werden.

4.3. Etablierung eines sensitiven PCR-Systems: 18S- und 28S-PCR

Aufgrund der steigenden Inzidenz invasiver *Zygomycosen* (Bitar, Van Cauteren et al. 2009; Neofytos, Horn et al. 2009), die häufig einen letalen Verlauf nehmen (Gonzalez, Rinaldi et al. 2002), erschien es wichtig, ein sensibles, zuverlässiges Nachweisverfahren zu etablieren. Zu diesem Zweck wurden das 18S- und 28S-System ausgetestet, die beide ein relativ kurzes Fragment des ribosomalen Pilzoperons als Target aufweisen.

21 *Zygomyceten*isolate, deren DNA aus Kulturen extrahiert worden war, wurden in der 18S- und 28S-PCR erfolgreich amplifiziert, wobei das sensitivere 28S-System meist die besseren Ct-Werte ergab und die Proben bis in höhere Verdünnungsstufen nachweisen konnte. Legt man die ungefähre Genomgröße von *Rhizopus*, dem klinisch häufigsten Vertreter der *Mucorales*, mit 46 fg zugrunde (Ma, Ibrahim et al. 2009), sind beide Systeme so sensitiv, dass theoretisch weniger als 1 Genom nachgewiesen werden kann.

Im Vergleich mit anderen Arbeiten, die ebenfalls ein empfindliches Amplifikationsverfahren ausgetestet haben und dabei das 18S- (Bialek, Konrad et al. 2005; Machouart, Larche et al. 2006; Hammond, Bialek et al. 2011), 28S- (Kasai, Harrington et al. 2008) oder das Cytochrom b-Gen (Hata, Buckwalter et al. 2008) als Target nutzten, erzielten die hier evaluierten Assays eine vergleichbar gute, zum Teil sogar bessere Sensitivität.

Um diese noch exakter zu validieren, wurden die Stammisolate zusätzlich als Triplikate amplifiziert, wobei die Messungen optimalerweise zu identischen Ergebnissen führen, d. h. alle 3 eingesetzten Proben sollen bis zur gleichen Verdünnungsstufe nachweisbar sein. Dies konnte nur in 4 von 10 Fällen erreicht werden, ansonsten wurden, mit einer Ausnahme (B5 in 18S), Übereinstimmungen in 2 von 3 Amplifikaten gesehen. Jedoch bestätigte die Austestung der Triplikate die in den Einfachmessungen ermittelten Nachweisgrenzen, die sich in beiden Systemen bei ca. 10^{-7} gruppierten.

In einer idealen PCR wird das Produkt in jedem Zyklus exponentiell verdoppelt, was sich in einer Steigung von -3,32 ausdrückt. Hier wurde eine mittlere Steigung von -3,61 und damit ein zufriedenstellendes Ergebnis, berechnet.

Die Stammisolate waren so ausgewählt worden, dass möglichst verschiedene Spezies der *Mucorales* vertreten waren, um evaluieren zu können, ob die PCR-Systeme ein breites Spektrum an Unterarten erfassen. Dies war in der Tat der Fall, lediglich das Isolat B12 (*Syncephalastrum species*) bereitete aufgrund eines Mismatches in der LNA-Sonde der 18S-PCR Probleme. Dieser Erreger, über den es bisher nur einen detaillierten Fallbericht gibt (Kamalam and Thambiah 1980), spielt jedoch im klinischen Alltag so gut wie keine Rolle (Ribes, Vanover-Sams et al. 2000; Hata, Buckwalter et al. 2008).

4.4. Etablierung der ITS2-PCR

Nachdem sich die ITS-Region in früheren Arbeiten als optimal erwiesen hatte, um *Zygomyceten* aus Kulturen auf Speziesebene zu identifizieren (Balajee, Borman et al. 2009), wurde zu diesem Zweck hier ein 400 bis 500bp langes Fragment ausgewählt. Durch die Amplifikation dieser speziesspezifischen Sequenz sollte genug Material für

eine anschließende Sequenzierung gewonnen werden. Im klinischen Alltag wird die Differenzierung der *Zygomyceten*stämme in Zukunft aufgrund ihrer variierenden Suszeptibilität (Dannaoui, Meletiadiis et al. 2003; Almyroudis, Sutton et al. 2007) eine Rolle spielen, wenn es darum geht, das geeignete Therapieregime auszuwählen.

Auch in diesem Assay war es möglich, alle Stammissolate zu amplifizieren, wobei erwartungsgemäß die Ct-Werte höher ausfielen und die Nachweisgrenzen meist um ca. 2 Zehnerpotenzen niedriger lagen, als in den beiden anderen Systemen.

Da durch das Fluoreszenzsignal der Real-time-PCR unspezifische Produkte nicht unmittelbar dargestellt werden, schloss sich die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate an, um zwischen spezifischen und unspezifischen Banden unterscheiden zu können, bevor im nächsten Schritt die Sequenzierung angestrebt wurde. Hier ergaben sich, meist bis zur Verdünnung 10^{-4} , klare Banden, deren Länge im erwarteten Bereich lag, so dass durch diesen Schritt der Erfolg der ITS2-PCR nochmals validiert werden konnte.

Die Ergebnisse der sich anschließenden Sequenzierung zeigten in 24% eine Abweichung zwischen mikrobiologischer und molekulargenetischer Identifizierung, was angesichts der Probleme, Pilze anhand von Kulturen zu identifizieren (Tarrand, Lichterfeld et al. 2003; Roden, Zaoutis et al. 2005; Balajee, Sigler et al. 2007), nicht verwunderlich ist und sich mit dem Ergebnis einer Studie deckt, in der sich in 21% eine Diskrepanz zwischen morphologischer und sequenzbasierter Diagnostik zeigte (Kontoyiannis, Lionakis et al. 2005). Bemerkenswert ist, dass in den Fällen, in denen das Ergebnis von der morphologischen Identifizierung abwich, die Sequenzierung dennoch ausschließlich *Zygomyceten* nachgewiesen hat. Dies konnte als erster Hinweis gedeutet werden, dass das ITS2-System diese Gattung spezifisch amplifiziert. Da eine kulturelle Artbestimmung doch recht subjektiven Kriterien unterworfen ist, kann das molekulare Ergebnis als das korrektere interpretiert werden.

Dieser Teil der ITS2-Etablierung zeigt außerdem, wie wichtig es ist, mikrobiologische Verfahren durch molekularbiologische Methoden abzusichern. Wären im Fall der Stammissolate Patienten gemäß der morphologischen Diagnose therapiert worden, hätten einige möglicherweise nicht das optimale Medikament erhalten, da sie tatsächlich durch eine andere Spezies infiziert gewesen wären.

Abschließend lässt sich feststellen, dass eine Identifizierung durch Sequenzierung der Amplifikationsprodukte zwar zeitaufwändiger ist als andere Methoden, wie z.B. Schmelzkurvenanalyse (Kasai, Harrington et al. 2008; Hrnčirova, Lengerova et al. 2010) oder Reverse-line-blot-Hybridisierung (Zhao, Li et al. 2011), in jedem Fall aber ein zuverlässiges Ergebnis erbringt und im Rahmen der Etablierung eines neuen PCR-Systems als Beweis dafür genutzt werden kann, dass dieses funktioniert.

4.5. Evaluierung der Spezifität

Die Spezifität der Assays, die durch den Einsatz von *Non-Mucorales*-, humaner und bakterieller DNA überprüft wurde, ergab für das 18S- und 28S-System 100, für das ITS2-System 69,23%. Die spezifische Vervielfältigung des *Zygomyceten*materials ist zum einen wichtig, da sich in klinischen Proben stets auch menschliche DNA befindet, die durch Ähnlichkeiten mit den Sequenzen der Pilze deren Amplifikation und Identifizierung behindern kann (Katz 1998). Zum anderen konnten Kontoyiannis et al. zeigen, dass in bis zu 40% Mischinfektionen mit *Mucorales* und anderen pathogenen Pilzen vorliegen (Kontoyiannis, Wessel et al. 2000). Diese voneinander differenzieren zu können, stellt für die adäquate Therapie der Patienten erneut eine wesentliche Voraussetzung dar.

4.6. Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit

Im Unterschied zum DNA-Nachweis aus Kulturen, besteht bei klinischem Material die zusätzlich Schwierigkeit, dass, wie bereits erwähnt, neben genetischem Material der Erreger sich stets auch humane DNA in den Proben befindet. Des Weiteren kann die Unterscheidung zwischen tatsächlicher Infektion, bloßer Kolonisation oder Kontamination oft Probleme bereiten. Eine rasche, korrekte Diagnosestellung ist jedoch unabdingbar, da jede Verzögerung der Therapie das Outcome des Patienten verschlechtert (Chamilos, Lewis et al. 2008). Die Überprüfung der klinischen Anwendbarkeit war daher ein essentieller Schritt der Etablierung der 3 Systeme.

4.6.1. Klinische Gewebeproben, Basel, nativ

10 klinische Proben, bei denen eine durch panfungale PCR nachgewiesene Pilzinfektion vorlag (5 *Mucorales*, 5 *Non-Mucorales*) wurden in die PCR-Systeme eingesetzt. Keiner der *Non-Mucorales* wurde amplifiziert, was die Spezifität der Assays erneut bestätigte. Die Amplifikation der *Zygomyceten* mit anschließender Sequenzierung brachte jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich um Nativproben aus dem Jahr 2009 handelte, bei denen es möglicherweise im Lauf der Zeit zur Degradation der DNA durch Nukleasen (Legrand, Mazancourt et al. 2002) gekommen ist.

4.6.2. Klinische Gewebeproben, Basel, Formalin fixiert

Durch die Fixierung mit Formalin und Einbettung in Paraffin können die krankheitsspezifischen Merkmale einer Gewebeprobe dauerhaft konserviert werden, so dass es möglich ist, eine Korrelation zwischen molekularen Befunden, Therapie und klinischem Outcome herzustellen (Lehmann and Kreipe 2001). Allerdings führt die Formalinfixierung zur Schädigung der Nukleinsäuren, da diese Crosslinks mit den

Proteinen des Gewebes ausbilden (Bonin, Petrera et al. 2003). Durch diese Fragmentierung der DNA können in der PCR längere Sequenzen nicht mehr amplifiziert werden (Dedhia, Tarale et al. 2007), während kurze sehr sensitiv nachgewiesen werden.

Dies erklärt, warum der Nachweis der Formalin fixierten Baseler *Zygomyceten*probe im ITS2-System nicht möglich war, in 28S dagegen einen Ct-Wert lieferte, der wesentlich niedriger lag, als bei den Nativproben. Alle 3 Systeme erwiesen sich auch diesmal als *mucorales*-spezifisch, sieht man von der Probe *Alternaria* ab, bei der, wie bereits erläutert, das Problem wohl eher in der mikrobiologischen Identifizierung zu suchen ist.

4.6.3. Artifizell infiziertes Gewebe

Die Notwendigkeit, trotz der geringen Fallzahlen molekularbiologische Nachweisverfahren invasiver *Zygomycosen* auf ihre klinische Anwendbarkeit hin zu überprüfen, hat bereits mehrere Forschungsgruppen dazu veranlasst, Pilzinfektionen im Tiermodell zu simulieren (Ibrahim, Bowman et al. 2005; Schwarz, Bretagne et al. 2006; Kasai, Harrington et al. 2008; Dannaoui, Schwarz et al. 2010). Nachdem Mäuse oder Kaninchen mit *Mucorales*stämmen infiziert worden waren, wurden ihre Organe, in der Regel Gehirn und Nieren, entnommen, aufbereitet und schließlich aus den Proben fungale DNA extrahiert und amplifiziert. In einigen Arbeiten wurde die Situation echter Patienten noch realistischer nachgeahmt, indem die Versuchstiere zusätzlich immunsupprimiert oder in eine diabetische Stoffwechsellage versetzt wurden.

In dieser Arbeit stand kein echtes Tiermodell zur Verfügung. Stattdessen wurde durch ein Fremdlabor tierisches Material aus Lungen- und Muskelgewebe toter Schweine mit Zygomyceten und anderen humanpathogenen Pilzen beimpft und über unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Auf diese Weise konnte eine echte Infektion zwar auch simuliert werden, sicherlich aber nicht so realistisch, wie in echten Tiermodellen. Sowohl die bereits durch das Fremdlabor extrahierte DNA, als auch die nativen Gewebeproben wurden verblindet zur Verfügung gestellt, d. h. bei der Mehrzahl der Proben waren zwar Herkunftsgewebe und Inkubationszeit bekannt, nicht aber, welche Erreger genau inokuliert worden waren.

Die Amplifikation der bereits auswärts extrahierten DNA lieferte in 23 von 50 Fällen ein positives Ergebnis. Damit war bewiesen, dass die Beimpfung erfolgreich durchgeführt worden war und sich die klinische Anwendbarkeit tatsächlich auf diesem Weg weiter evaluieren ließ. Wie bereits in allen vorausgegangenen Versuchsschritten erwies sich auch hier die 28S-PCR erneut als das sensitivste System. Die 84 Gewebeproben konnte nur in geringer Zahl amplifiziert werden, mit 26 positiven Resultaten lieferte auch hier

der 28S-Assay die größte Ausbeute. Auffällig war hier, dass die meisten Signale aus Lungengewebe erzielt werden konnten, was mit der Affinität der *Zygomyceten* zu diesem Organ korreliert.

Alle in diesem Versuchsteil ermittelten Ct-Werte lagen deutlich höher als bei der Amplifikation der Stammisolate aus den Kulturen, was als Hinweis darauf gedeutet werden kann, dass die Erreger in der Klinik aus Biopsien oft schwer nachweisbar sind. In der sich anschließenden Sequenzierung fanden sich unter den Extrakten viele Gemische, während mehrere der Gewebeproben nicht auswertbar waren. Angesichts der Unklarheit der eingespiketen Pilze erscheint dieses Resultat jedoch nicht verwunderlich. Darüberhinaus ist anzunehmen, dass durch das Beimpfungsverfahren in den einzelnen Proben sehr unterschiedliche DNA-Konzentrationen vorlagen. Bleiben diese unter dem Detektionslimit, ist keine spezifische Amplifikation möglich (Bialek, Konrad et al. 2005). Zudem liegen für die molekulare Identifikation von *Zygomyceten* bis heute nur wenige Daten vor, so dass sich für manche Arten nur eine geringe Zahl repräsentativer Stämme in den Datenbanken finden (Voigt, Cigelnik et al. 1999; Schwarz, Bretagne et al. 2006). Diese Referenzdaten sollen außerdem in bis zu 20% fehlerbehaftet sein (Nilsson, Ryberg et al. 2006) und bereiten bei der Identifikation Probleme, wenn Unterarten nahe verwandt sind, wie z. B. *Rhizopus microsporus* und *Rhizopus azygosporus*. Auch die instabile Taxonomie der *Mucorales* trägt zu Schwierigkeiten in der korrekten Identifizierung bei, denn teilweise erscheinen einige Arten innerhalb weniger Monate unter verschiedenen Synonymen (Dannaoui, Schwarz et al. 2010). Dennoch konnten in einigen Proben eindeutig *Zygomyceten* identifiziert werden, was wiederum die klinische Anwendbarkeit der Assays belegt. Hier zeigte sich eine eindeutige Dominanz von *Rhizopus*, der als der häufigste humanpathogene Vertreter der *Mucorales* gilt (Petrikos, Skiada et al. 2012) und bevorzugt die paranasalen Sinus und die Lunge befällt (Ribes, Vanover-Sams et al. 2000), was wiederum unterstreicht, dass durch die Vakzination des Gewebes eine realistische klinische Konstellation imitiert werden konnte.

Abschließend ist dieses Experiment zur Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit durchaus positiv zu beurteilen.

4.6.4. Klinische BAL-Proben

Während Infektionen durch *Zygomyceten* im Allgemeinen häufig den Respirationstrakt betreffen, stellt der pulmonale Befall bei neutropenischen und stammzelltransplantierten Patienten die häufigste Manifestationsform dar (Morrison and McGlave 1993; Marr, Carter et al. 2002). Dabei treten nicht selten Mischinfektionen mit *Aspergillus spp.* und anderen pathogenen Pilzen auf (Scheld, Royston et al. 1979). Die Diagnosestellung kann allerdings Probleme bereiten, da die

direkte Untersuchung von BAL-Flüssigkeit oft ohne eindeutiges Ergebnis bleibt. Ist eine Isolierung von *Zygomyceten* jedoch bei einem Risikopatienten, der entsprechende klinische Symptome zeigt, möglich, sollte dies unbedingt als Hinweis auf eine ernst zunehmende Infektion gewertet werden (al-Abadi, Russo et al. 1997; Glazer, Nusair et al. 2000).

Insgesamt präsentiert sich die pulmonale Form der *Mucormykose* mit unspezifischen Symptomen, die von einem Befall durch *Aspergillus spp.* oft nicht zu unterscheiden sind (Petrikos, Skiada et al. 2012). Die erforderliche Differenzierung muss daher anderweitig erfolgen, wobei molekularbiologische Verfahren eine wichtige Rolle spielen.

Aus diesem Grund wurden 96 klinische BAL-Proben der Routinediagnostik in die 18S- und ITS2-PCR eingesetzt. 15 dieser Proben waren zuvor positiv auf *Aspergillus* getestet worden, und es wurde vermutet, dass einige eine konkomitante Infektion mit *Zygomyceten* aufweisen würden. Tatsächlich ergab aber nur ein Exemplar ein schwaches Signal in der ITS2-PCR, was sich später als Kontamination erwies. Da die *Aspergillus*-DNA nahezu mit dem identischen Protokoll des *Zygomyceten*-Assays extrahiert worden war, hätte auf diesem Weg auch *Zygomyceten*material gewonnen werden müssen. Daraus lässt sich schließen, dass die untersuchten Proben tatsächlich keine *Mucorales*-DNA enthielten und Mischinfektionen wohl doch nicht so häufig vorkommen, wie bisher angenommen.

4.7. Vergleich der PCR-Systeme mit ähnlichen Projekten

Nachdem die Polymerase-Kettenreaktion seit einigen Jahren erfolgreich zur Identifikation von Pilzen eingesetzt wird (Makimura, Murayama et al. 1994; Kappe, Okeke et al. 1998), haben sich verschiedene Arbeitsgruppen darum bemüht, den molekularbiologischen Nachweis dieser Erreger zu optimieren. 3 eigene Systeme wurden entwickelt, die Elemente anderer Projekte enthalten, zum Teil aber völlig neue Konzepte darstellen. Sie sollen kurz mit anderen Arbeiten verglichen werden.

4.7.1. 18S-PCR

Die 18S-PCR weist *Zygomyceten* nach, ohne gleichzeitig DNA anderer humanpathogener Pilze zu amplifizieren. Da die Zielsequenz mit ca. 180bp aus einem kurzen Fragment besteht, ist in diesem System ein sensitiver Nachweis aller klinisch relevanten Vertreter der *Mucorales*, mit Ausnahme von *Syncephalastrum*, möglich. Gleichzeitig konnte durch den Einsatz relativ langer Primer (23 und 24 Nukleotide) und einer LNA-Sonde eine hohe Spezifität erreicht werden. Als TaqMan-Assay konzipiert, finden hier Amplifikation und Quantifizierung der Produkte in einem Arbeitsschritt

statt. Die Differenzierung der verschiedenen Spezies erfolgt in einer sich anschließenden Sequenzierung.

Dieses System wurde in Anlehnung an eine Arbeit von Bialek et al. (Bialek, Konrad et al. 2005) entwickelt, in der ebenfalls *Zygomyceten* nachgewiesen wurden. Zwar war hier auch ein ca. 180bp langes Fragment des 18S-Gen des ribosomalen Operons als Target verwendet worden, allerdings kam hier das System der sog. Nested-PCR zum Einsatz. Diese ermöglicht in ähnlicher Weise einen sensitiven und spezifischen Nachweis der Erreger, weist aber den großen Nachteil auf, dass die Proben zur Durchführung des zweiten Amplifikationsschrittes nochmals geöffnet werden müssen, wodurch das System sehr kontaminationsanfällig wird. Zudem entfällt hier die Möglichkeit der simultanen Quantifizierung der PCR-Produkte. Durch die sich anschließende Sequenzierung findet die Identifikation der *Mucorales*arten statt.

Im Gegensatz dazu wollte die Arbeitsgruppe um Machouart (Machouart, Larche et al. 2006) den doch recht zeitaufwendigen Schritt der Sequenzierung umgehen. Sie entwickelte ein konventionelles Amplifikationsverfahren im Bereich des 18S-Gens, bei dem durch ein Primergemisch 4 Hauptarten der *Zygomyceten* nachgewiesen werden können, die im Anschluss daran mit Hilfe eines RFLP-Assays in die verschiedenen Spezies aufgeschlüsselt werden. Dieses System nimmt zwar weniger Zeit in Anspruch als eine sequenzbasierte Identifizierung, ist dafür aber auf den Nachweis von nur 4 Arten beschränkt, was angesichts der Vielfalt der *Mucorales* im klinischen Alltag durchaus problematisch werden kann.

4.7.2. 28S-PCR

Die 28S-PCR, die ebenfalls als TaqMan-Real-Time-Assay konzipiert ist, weist ein nur 110bp langes Fragment des hochkonservierten 28S-RNA-Gens nach, anhand dessen ebenfalls *Mucorales* von anderen humanpathogenen Pilzen unterschieden werden können. Hier kommt zum ersten Mal eine derart kurze Sequenz, die dennoch in der Lage ist, die wichtigsten Arten der *Zygomyceten* zu detektieren, zum Einsatz, was dem System eine hohe Sensitivität verleiht. Da der Nachweis von filamentösen Pilzen in Formalin fixierten, paraffinisierten Proben im klinischen Alltag zunehmend an Bedeutung gewinnt, das enthaltene genetische Material durch die Fixation jedoch stark fragmentiert wird, wird die 28S-PCR hier möglicherweise einen wichtigen Stellenwert einnehmen.

Kasai et al. entwickelten ebenfalls 2 Real-Time-PCRs, die die 28S-Sequenz als Target nutzen. Allerdings können diese Systeme nur 3 verschiedene *Mucorales* nachweisen. Dies wird von der Arbeitsgruppe damit begründet, dass es in dieser hochkonservierten Region nicht möglich ist, ein Primer-Paar zu entwickeln, das die Amplifikation aller Hauptvertreter der *Zygomyceten* erlaubt, ohne gleichzeitig an tierische oder humane

DNA zu binden. Dadurch würde sich entweder die Effizienz, oder aber die Spezifität des Verfahrens reduzieren (Kasai, Harrington et al. 2008).

Im Gegensatz dazu amplifiziert das eigene System weder humane DNA, noch kann es als ineffizient bezeichnet werden.

4.7.3. ITS2-PCR

Die ITS-Region des ribosomalen Operons, die aufgrund ihrer speziesspezifischen Sequenzen als „Barcode-Gen“ der *Zygomyceten* bezeichnet wird (Hebert, Ratnasingham et al. 2003; Schwarz, Bretagne et al. 2006) wurde in der Vergangenheit für viele verschiedene PCR-Designs genutzt, z.B. (Schwarz, Bretagne et al. 2006; Lau, Chen et al. 2007; Lechevalier, Hermoso et al. 2008; Balajee, Borman et al. 2009; Dannaoui, Schwarz et al. 2010; Zhao, Li et al. 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine dritte Real-Time-PCR konzipiert, deren Besonderheit darin bestand, dass die Sonde im hochkonservierten Übergangsbereich zur 28S-Region platziert wurde, während die Primer speziesspezifische Bereiche flankieren. Auf diese Weise wird aus einer panfungalen PCR, die von vielen anderen Arbeitsgruppen unter Verwendung der universellen Primer ITS1 (5`-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`) und ITS2 (5`-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3`) (Dannaoui, Schwarz et al. 2010) durchgeführt wurde, ein *Zygomyceten*-spezifisches Amplifikationsverfahren, das durch eine anschließende Sequenzierung die für den Klinikalltag so wichtige Speziesdifferenzierung ermöglicht.

Besteht der Bedarf, andere Arten, wie z. B. *Aspergillen*, nachzuweisen oder doch eine panfungale Amplifikation durchzuführen, kann dieser Assay aufgrund der geschickten Platzierung der Sonde jederzeit durch Einsatz entsprechender Primer auch dafür genutzt werden.

5. Ausblick

In der Therapie hämatoonkologischer Erkrankungen, die einen wichtigen Risikofaktor für invasive Pilzinfektionen darstellen, werden derzeit enorme Fortschritte erzielt, etwa durch den Einsatz spezifischer Antikörper oder die allogene Stammzelltransplantation. Ebenso wichtig erscheint es jedoch, diese Hochrisikopatienten vor opportunistischen Infektionen zu schützen, was nur gelingen kann, wenn diese rechtzeitig durch effektive diagnostische Maßnahmen erkannt werden.

Nachdem es nun gelungen ist, ein sowohl sensitives, als auch spezifisches Nachweisverfahren invasiver *Zygomycosen* zu etablieren und evaluieren, sollte dessen klinische Anwendbarkeit weiter ausgebaut werden. Dazu wäre es sinnvoll, eine größere Anzahl echter klinischer Proben zu untersuchen. Da diese nur in sehr begrenzter Zahl zur Verfügung stehen, kann dies nur realisiert werden, indem verschiedene Labore, die sich mit dem Nachweis von Pilzen beschäftigen, miteinander kooperieren und Untersuchungsmaterial gegenseitig austauschen. Außerdem bietet sich die Durchführung sog. Ringversuche an. Diese Methode der Qualitätssicherung besteht darin, dass identische Analysenproben gleichzeitig und unabhängig voneinander von verschiedenen Laboratorien mit identischen Verfahren untersucht werden. Der sich anschließende Vergleich der Ergebnisse könnte eine wichtige Aussage darüber erlauben, ob die entwickelten PCR-Assays tatsächlich für eine breite Anwendung im klinischen Alltag geeignet sind, nämlich dann, wenn sie im Ringversuch reproduzierbare, valide Resultate liefern. Aktuell würde sich hier eine Zusammenarbeit mit den bereits involvierten Instituten in Basel und Innsbruck anbieten

6. Zusammenfassung

Invasive *Zygomycosen* verzeichnen in den letzten Jahren eine steigende Inzidenz, insbesondere im Risikokollektiv immunsupprimierter Patienten. Aufgrund des häufig letalen Verlaufs dieser Infektionen ist eine rasche, korrekte Diagnosestellung essentiell, um rechtzeitig eine adäquate Therapie einzuleiten. Jedoch sieht sich die konventionelle, mikrobiologische Diagnostik mit vielen Problemen konfrontiert, so dass molekularbiologische Nachweisverfahren zunehmend in den Fokus der Aufmerksamkeit rücken. Eine zuverlässige, mit relativ geringem Zeit- und Kostenaufwand praktikierbare Methode stellt in diesem Zusammenhang die Real-time-PCR dar, deren Aussagekraft durch anschließende Speziesidentifizierung mittels Sequenzierung noch verstärkt werden kann.

Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit 3 PCR-Assays entwickelt und deren Sensitivität, Spezifität und klinische Anwendbarkeit evaluiert. Alle 3 Systeme nutzten Multi-copy-Gene des ribosomalen Operons der Zygomyceten als Target und erwiesen sich als zuverlässige Werkzeuge zur Amplifikation fungaler DNA. Sie wurde sowohl an Pilzkulturen, als auch an klinischen Proben und einem Quasi-Tiermodell mit Erfolg ausgetestet und werden möglicherweise in Zukunft der klinischen Routinediagnostik zur Verfügung stehen.

Bedingt durch die Seltenheit invasiver *Zygomycosen* besteht in diesem Bereich noch ein großer Forschungsbedarf, auch, um die noch nicht optimale Therapie dieser Erkrankungen zu verbessern. Es bleibt daher zu hoffen, dass sich in absehbarer Zeit mehr Forschungsgruppen mit diesen Erregern beschäftigen, damit den schwer kranken Patienten eine echte Heilungschance geboten werden kann.

7.Literaturverzeichnis

- Abe, A., Y. Oda, et al.** (2006). "The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences." Biosci Biotechnol Biochem 70(10): 2387-2393.
- al-Abadi, M. A., K. Russo, et al.** (1997). "Pulmonary mucormycosis diagnosed by bronchoalveolar lavage: a case report and review of the literature." Pediatr Pulmonol 23(3): 222-225.
- Alastruey-Izquierdo, A., M. V. Castelli, et al.** (2009). "In vitro activity of antifungals against Zygomycetes." Clin Microbiol Infect 15 Suppl 5: 71-76.
- Almyroudis, N. G., D. A. Sutton, et al.** (2007). "In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents." Antimicrob Agents Chemother 51(7): 2587-2590.
- Apfalter, P., U. Reischl, et al.** (2005). "In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results?" J Clin Microbiol 43(12): 5835-5841.
- Baker, S. E. (2006).** "Aspergillus niger genomics: past, present and into the future." Med Mycol 44 Suppl 1: S17-21.
- Balajee, S. A., A. M. Borman, et al.** (2009). "Sequence-based identification of *Aspergillus*, *fusarium*, and *mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here?" J Clin Microbiol 47(4): 877-884.
- Balajee, S. A., L. Sigler, et al.** (2007). "DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century." Med Mycol 45(6): 475-490.
- Bhatti, Z., A. Shaikat, et al.** (2006). "Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients." Mycopathologia 162(1): 1-15.
- Bialek, R., F. Konrad, et al.** (2005). "PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue." J Clin Pathol 58(11): 1180-1184.
- Bitar, D., D. Van Cauteren, et al.** (2009). "Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997-2006." Emerg Infect Dis 15(9): 1395-1401.
- Bohme, A., M. Ruhnke, et al.** (2009). "Treatment of invasive fungal infections in cancer patients--recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO)." Ann Hematol 88(2): 97-110.
- Bonin, S., F. Petrera, et al.** (2003). "PCR analysis in archival postmortem tissues." Mol Pathol 56(3): 184-186.
- Brookman, J. L. and D. W. Denning** (2000). "Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*." Curr Opin Microbiol 3(5): 468-474.
- Buzina, W., H. Braun, et al.** (2003). "Fungal biodiversity--as found in nasal mucus." Med Mycol 41(2): 149-161.
- Chamilos, G., R. E. Lewis, et al.** (2008). "Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis." Clin Infect Dis 47(4): 503-509.
- Chamilos, G., E. M. Marom, et al.** (2005). "Predictors of pulmonary zygomycosis versus invasive pulmonary aspergillosis in patients with cancer." Clin Infect Dis 41(1): 60-66.
- Chen, S. C., C. L. Halliday, et al.** (2002). "A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays." Med Mycol 40(4): 333-357.

- Dannaoui, E., J. Meletiadis, et al.** (2003). "In vitro susceptibilities of zygomycetes to conventional and new antifungals." J Antimicrob Chemother 51(1): 45-52.
- Dannaoui, E., P. Schwarz, et al.** (2010). "Molecular detection and identification of zygomycetes species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis: a collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) evaluation." J Clin Microbiol 48(6): 2043-2046.
- Dedhia, P., S. Tarale, et al.** (2007). "Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues." Asian Pac J Cancer Prev 8(1): 55-59.
- Ebeling, W., N. Hennrich, et al.** (1974). "Proteinase K from *Tritirachium album* Limber." Eur J Biochem 47(1): 91-97.
- Einsele, H., H. Hebart, et al.** (1997). "Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes." J Clin Microbiol 35(6): 1353-1360.
- Eucker, J., O. Sezer, et al.** (2001). "Mucormycoses." Mycoses 44(7-8): 253-260.
- Faggi, E., G. Pini, et al.** (2005). "Use of magnetic beads to extract fungal DNA." Mycoses 48(1): 3-7.
- Fredricks, D. N., C. Smith, et al.** (2005). "Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR." J Clin Microbiol 43(10): 5122-5128.
- Glazer, M., S. Nusair, et al.** (2000). "The role of BAL in the diagnosis of pulmonary mucormycosis." Chest 117(1): 279-282.
- Gonzalez, C. E., M. G. Rinaldi, et al.** (2002). "Zygomycosis." Infect Dis Clin North Am 16(4): 895-914, vi.
- Greenberg, R. N., L. J. Scott, et al.** (2004). "Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments." Curr Opin Infect Dis 17(6): 517-525.
- Hadaschik, E., R. Koschny, et al.** (2012). "Pulmonary, rhino-orbital and cutaneous mucormycosis caused by *Rhizomucor pusillus* in an immunocompromised patient." Clin Exp Dermatol 37(4): 355-357.
- Hammond, S. P., R. Bialek, et al.** (2011). "Molecular methods to improve diagnosis and identification of mucormycosis." J Clin Microbiol 49(6): 2151-2153.
- Hata, D. J., S. P. Buckwalter, et al.** (2008). "Real-time PCR method for detection of zygomycetes." J Clin Microbiol 46(7): 2353-2358.
- Hebert, P. D., S. Ratnasingham, et al.** (2003). "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species." Proc Biol Sci 270 Suppl 1: S96-99.
- Hofman, V., A. Dhouibi, et al.** (2010). "Usefulness of molecular biology performed with formaldehyde-fixed paraffin embedded tissue for the diagnosis of combined pulmonary invasive mucormycosis and aspergillosis in an immunocompromised patient." Diagn Pathol 5: 1.
- Hrncirova, K., M. Lengerova, et al.** (2010). "Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis." J Clin Microbiol 48(9): 3392-3394.
- Ibrahim, A. S., J. C. Bowman, et al.** (2005). "Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-beta-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis." Antimicrob Agents Chemother 49(2): 721-727.
- Ibrahim, A. S., B. Spellberg, et al.** (2012). "Pathogenesis of mucormycosis." Clin Infect Dis 54 Suppl 1: S16-22.

- Iwen, P. C., S. H. Hinrichs, et al.** (2002). "Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens." Med Mycol 40(1): 87-109.
- Kamalam, A. and A. S. Thambiah** (1980). "Cutaneous infection by *Syncephalastrum*." Sabouraudia 18(1): 19-20.
- Kappe, R., C. N. Okeke, et al.** (1998). "Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue." J Med Microbiol 47(9): 811-820.
- Karakousis, A., L. Tan, et al.** (2006). "An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR." J Microbiol Methods 65(1): 38-48.
- Kasai, M., S. M. Harrington, et al.** (2008). "Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis." J Clin Microbiol 46(11): 3690-3702.
- Katz, L. A.** (1998). "Changing perspectives on the origin of eukaryotes." Trends Ecol Evol 13(12): 493-497.
- Khot, P. D., D. L. Ko, et al.** (2009). "Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays." Appl Environ Microbiol 75(6): 1559-1565.
- Kontoyiannis, D. P., R. E. Lewis, et al.** (2012). "Future directions in mucormycosis research." Clin Infect Dis 54 Suppl 1: S79-85.
- Kontoyiannis, D. P., M. S. Lionakis, et al.** (2005). "Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of *Aspergillus*-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases." J Infect Dis 191(8): 1350-1360.
- Kontoyiannis, D. P., V. C. Wessel, et al.** (2000). "Zygomycosis in the 1990s in a tertiary-care cancer center." Clin Infect Dis 30(6): 851-856.
- Kwok, S. and R. Higuchi** (1989). "Avoiding false positives with PCR." Nature 339(6221): 237-238.
- Kwon-Chung, K. J.** (2012). "Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives." Clin Infect Dis 54 Suppl 1: S8-S15.
- Lau, A., S. Chen, et al.** (2007). "Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens." J Clin Microbiol 45(2): 380-385.
- Lechevalier, P., D. G. Hermoso, et al.** (2008). "Molecular diagnosis of *Saksenaea vasiformis* cutaneous infection after scorpion sting in an immunocompetent adolescent." J Clin Microbiol 46(9): 3169-3172.
- Lee, L. G., C. R. Connell, et al.** (1993). "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes." Nucleic Acids Res 21(16): 3761-3766.
- Legrand, B., P. Mazancourt, et al.** (2002). "DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues." Forensic Sci Int 125(2-3): 205-211.
- Lehmann, U. and H. Kreipe** (2001). "Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies." Methods 25(4): 409-418.
- Lewis, R. E., O. Lortholary, et al.** (2012). "How does antifungal pharmacology differ for mucormycosis versus aspergillosis?" Clin Infect Dis 54 Suppl 1: S67-72.
- Liu, M., B. Spellberg, et al.** (2010). "The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice." J Clin Invest 120(6): 1914-1924.
- Loeffler, J., H. Hebart, et al.** (1999). "Contaminations occurring in fungal PCR assays." J Clin Microbiol 37(4): 1200-1202.
- Loeffler, J., N. Henke, et al.** (2000). "Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system." J Clin Microbiol 38(2): 586-590.

- Loeffler, J., K. Schmidt, et al.** (2002). "Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system." J Clin Microbiol 40(6): 2240-2243.
- Ma, L. J., A. S. Ibrahim, et al.** (2009). "Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication." PLoS Genet 5(7): e1000549.
- Machouart, M., J. Larche, et al.** (2006). "Genetic identification of the main opportunistic Mucorales by PCR-restriction fragment length polymorphism." J Clin Microbiol 44(3): 805-810.
- Makimura, K., S. Y. Murayama, et al.** (1994). "Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction." J Med Microbiol 40(5): 358-364.
- Manian, S., S. Sreenivasaprasad, et al.** (2001). "DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi." Lett Appl Microbiol 33(4): 307-310.
- Marr, K. A., R. A. Carter, et al.** (2002). "Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients." Clin Infect Dis 34(7): 909-917.
- Millon, L., F. Grenouillet, et al.** (2011). "Ribosomal and mitochondrial DNA target for real-time PCR diagnosis of invasive aspergillosis." J Clin Microbiol 49(3): 1058-1063.
- Morrison, V. A. and P. B. McGlave** (1993). "Mucormycosis in the BMT population." Bone Marrow Transplant 11(5): 383-388.
- Nagao, K., T. Ota, et al.** (2005). "Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene." J Dermatol Sci 39(1): 23-31.
- Nakamura, A., Y. Sugimoto, et al.** (2010). "Diagnostic value of PCR analysis of bacteria and fungi from blood in empiric-therapy-resistant febrile neutropenia." J Clin Microbiol 48(6): 2030-2036.
- Neofytos, D., D. Horn, et al.** (2009). "Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry." Clin Infect Dis 48(3): 265-273.
- Nilsson, R. H., M. Ryberg, et al.** (2006). "Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective." PLoS One 1: e59.
- Petrikkos, G., A. Skiada, et al.** (2012). "Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis." Clin Infect Dis 54 Suppl 1: S23-34.
- Radner, A. B., M. D. Witt, et al.** (1995). "Acute invasive rhinocerebral zygomycosis in an otherwise healthy patient: case report and review." Clin Infect Dis 20(1): 163-166.
- Reiss, E., T. Obayashi, et al.** (2000). "Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections." Med Mycol 38 Suppl 1: 147-159.
- Ribes, J. A., C. L. Vanover-Sams, et al.** (2000). "Zygomycetes in human disease." Clin Microbiol Rev 13(2): 236-301.
- Rickerts, V., S. Mousset, et al.** (2007). "Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens." Clin Infect Dis 44(8): 1078-1083.
- Roden, M. M., T. E. Zaoutis, et al.** (2005). "Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases." Clin Infect Dis 41(5): 634-653.
- Rogers, T. R.** (2008). "Treatment of zygomycosis: current and new options." J Antimicrob Chemother 61 Suppl 1: i35-40.
- Roilides, E., D. P. Kontoyannis, et al.** (2012). "Host defenses against zygomycetes." Clin Infect Dis 54 Suppl 1: S61-66.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al.** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-5467.
- Scheld, W. M., D. Royston, et al.** (1979). "Simultaneous disseminated aspergillosis and zygomycosis in a leukemic patient." South Med J 72(10): 1325-1328.

- Schrodl, W., T. Heydel, et al.** (2012). "Direct analysis and identification of pathogenic Lichtheimia species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analyzer-mediated mass spectrometry." *J Clin Microbiol* 50(2): 419-427.
- Schwarz, P., S. Bretagne, et al.** (2006). "Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues." *J Clin Microbiol* 44(2): 340-349.
- Selitrennikoff, C. P.** (2001). "Antifungal proteins." *Appl Environ Microbiol* 67(7): 2883-2894.
- Skiada, A., L. Pagano, et al.** (2011). "Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007." *Clin Microbiol Infect* 17(12): 1859-1867.
- Smith, J. A. and C. A. Kauffman** (2012). "Pulmonary Fungal Infections." *Respirology*.
- Spellberg, B., J. Edwards, Jr., et al.** (2005). "Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management." *Clin Microbiol Rev* 18(3): 556-569.
- Spellberg, B., A. Ibrahim, et al.** (2012). "Combination therapy for mucormycosis: why, what, and how?" *Clin Infect Dis* 54 Suppl 1: S73-78.
- Tarrand, J. J., M. Lichterfeld, et al.** (2003). "Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination." *Am J Clin Pathol* 119(6): 854-858.
- Vitale, R. G., G. S. de Hoog, et al.** (2012). "Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the order mucorales." *J Clin Microbiol* 50(1): 66-75.
- Voigt, K., E. Cigelnik, et al.** (1999). "Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data." *J Clin Microbiol* 37(12): 3957-3964.
- Wahba, H., M. T. Truong, et al.** (2008). "Reversed halo sign in invasive pulmonary fungal infections." *Clin Infect Dis* 46(11): 1733-1737.
- Walsh, T. J., B. E. Bloom, et al.** (2012). "Meeting the challenges of an emerging pathogen: the Henry Schueler 41&9 Foundation International Forum on Mucormycosis." *Clin Infect Dis* 54 Suppl 1: S1-4.
- Walsh, T. J., M. N. Gamaletsou, et al.** (2012). "Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis)." *Clin Infect Dis* 54 Suppl 1: S55-60.
- White, M. M., T. Y. James, et al.** (2006). "Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data." *Mycologia* 98(6): 872-884.
- Yeo, S. F. and B. Wong** (2002). "Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections." *Clin Microbiol Rev* 15(3): 465-484.
- Zhao, Z., L. Li, et al.** (2011). "Simultaneous detection and identification of Aspergillus and mucorales species in tissues collected from patients with fungal rhinosinusitis." *J Clin Microbiol* 49(4): 1501-1507.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AG	Arbeitsgruppe
ARS	Agricultural Researc Service
ATCC	AmericanType Culture Collection
B	Basengemisch aus Cytosin, Guanin und Thymin
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BH Q	BlackHole Quencher (Fluoreszenzfarbstoff)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CH	Schweiz
cm ²	Quadratzenimeter
Ct	Treshold cycle, Schwellenwert
CT	Computertomografie
d	Dies/Diei, Tag/Tage
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanidintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
d. h.	das heißt

DNA	Desoxyribonukleinsäure
Do	Donnerstag
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eff%	Effizienz
FAM	Fluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
fg	Femtogramm
Fr	Freitag
et al.	et alii, und andere
g	Gramm
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	Guanin
G-CSF	Granulozytenwachstumsfaktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Wachstumsfaktor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
ITS	Internal-transcribed-spacer
i.v.	intravenös
L	Lunge
LNA	locked nucleid acid
M	Muskel
min	Minute(n)
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimol
Mo	Montag
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
OH	hydroxy-
p	Probe, Sonde
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PD	Privatdozent
R	Basengemisch aus Adenin und Guanin
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
R2	Korrelationskoeffizient
s.	siehe
sec	Sekunden
sog.	sogenannt/-e/-er
spp.	Species, mehrere Arten
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin (Fluoreszenzfarbstoff)
Taq	Thermus aquaticus
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trisaminomethan
u. a.	unter anderem
UNG	Uracil-N-Glykosylase
UV	ultraviolett

V	Volt
vs.	versus
W	Basengemisch aus Adenin und Thymin
Y	Basengemisch aus Cytosin und Thymin
Y-Inter	Y-Intercept
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z. T.	zum Teil

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte

Tabelle 2: Verbrauchsgegenstände

Tabelle 3: Reagenzien

Tabelle 4: Kits

Tabelle 5: Primer und Sonde, 18S-Assay

Tabelle 6: Primer und Sonde, 28S-Assay

Tabelle 7: Primer und Sonde, ITS2-Assay

Tabelle 8: Stammissolate aus Würzburger Kulturen

Tabelle 9: Stammissolate aus Baseler Kulturen

Tabelle 10: Klinische Nativproben, Basel

Tabelle 11: Formalin fixierte klinische Proben, Basel

Tabelle 12: Weitere *Mucorales*, AG Löffler, Uniklinik Würzburg

Tabelle 13: *Non-Mucorales*, AG Löffler, Uniklinik Würzburg

Tabelle 14: Extrahierte DNA, Innsbruck

Tabelle 15: Gewebeproben, Innsbruck, Charge 1

Tabelle 16: Gewebeproben, Innsbruck, Charge 2

Tabelle 17: Gewebeproben, Innsbruck, Charge 3

Tabelle 18: BAL-Proben

Tabelle 19: Sonstige DNA

Tabelle 20: Fremdlabore und kooperierende Kliniken

Tabelle 21: Reaktionsansatz der *Zygomyceten*-Real-time-PCR im 18S- und 28S-System

Tabelle 22: Reaktionsansatz der *Zygomyceten*-Real-time-PCR im ITS2-System

Tabelle 23: DNA-Konzentration der Stammsolate

Tabelle 24: Ct-Werte 18S und 28S, Stammsolate, Verdünnung 10^{-1}

Tabelle 25: Ct-Werte 18S und 28S, Stammsolate, Verdünnung 10^{-3}

Tabelle 26: Ct-Werte 18S und 28S, Stammsolate, Verdünnungsreihen

Tabelle 27: Nachweisgrenzen und untere Detektionslimits der Stammsolate, 18S und 28S

Tabelle 28: lineare Korrelation und Effizienz der 18S- und 28S-PCR, Stammsolate

Tabelle 29: Nachweisgrenzen und Sensitivitätsraten der Stammsolate, Triplikate, 18S und 28S

Tabelle 30: lineare Korrelation und Effizienz der 18S- und 28S-PCR, Stammsolate, Triplikate

Tabelle 31: Ct-Werte ITS2, Stammsolate, niedrige Verdünnungsstufen, 54°C und 55°C

Tabelle 32: Ct-Werte ITS2, Stammsolate, mittlere Verdünnungsstufen

Tabelle 33: Ct-Werte ITS2, Stammsolate, hohe Verdünnungsstufen

Tabelle 34: Nachweisgrenzen und Sensitivitätsraten der Stammsolate, ITS2

Tabelle 35: Nachweisgrenzen der Systeme im Vergleich

Tabelle 36: Stammsolate, Gelelektrophorese

Tabelle 37: Ergebnisse der ITS2-Sequenzierung

Tabelle 38: Ct-Werte *Non-Mucorales*-PCR

Tabelle 39: Ct-Werte klinische Nativproben, Basel

Tabelle 40: Ct-Werte klinische Formalin fixierte Proben, Basel

Tabelle 41: Ct-Werte DNA-Extrakte, Innsbruck, 18S und 28S

Tabelle 42: Ergebnis der Sequenzierung der DNA-Extrakte, 18S, Innsbruck

Tabelle 43: Ct-Werte, Gewebeproben Innsbruck, 18S, 28S, ITS2

Tabelle 44: Ergebnis der Sequenzierung der Gewebeproben, Innsbruck, 18S

Tabelle 45: Referenzstämme mit Zugangsnummern der Datenbank, 18S-System

Tabelle 46: Referenzstämme mit Zugangsnummern der Datenbank, 28S-System

Tabelle 47: Referenzstämme mit Zugangsnummern der Datenbank, ITS2-System

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentuale Verteilung klinisch relevanter *Zygomyceten* in einer Studie von Skiada et al.

Abbildung 2: Mikroskopische Morphologie von *Rhizopus species*

Abbildung 3: Das ribosomale Operon der Pilze

Abbildung 4: Prinzip der TaqMan-Real-time PCR

Abbildung 5: Amplifikationsprofil einer Real-time-PCR (A) und Standardkurve (B)

Abbildung 6: Effizienz des 18S- und 28S-Systems im Vergleich

Abbildung 7: Beispiel einer Amplifikation von 5 Proben als Triplikat

Abbildung 8: Sensitivität der PCR-Systeme im Vergleich

Abbildung 9: Agarosegel, Stammisolate

Abbildung 10: Vergleich mikrobiologische Identifizierung – Sequenzierung

Abbildung 11: Spezifität der *Non-Mucorales*-PCR

Abbildung 12: Verteilung der Ergebnisse, 18S- und 28S-PCR, Extrakte, Innsbruck

Abbildung 13: Anzahl der positiven Proben pro System im Vergleich, Gewebe, Innsbruck

Abbildung 14: Vergleich der Amplifikatzahlen anhand des Gewebetyps

8.4. Referenzstämme mit Zugangsnummern der Datenbank

8.4.1. 18S-System

Tabelle 45: Referenzstämme mit Zugangsnummern der Datenbank, 18S-System

Species	Nummer des Referenzstamms	Zugangsnummer, GenBank
Mucorales		
<i>Absidia coerulea</i>	CBS 104.08	AF113405/AF113443
<i>Absidia corymbifera</i>	CBS 100.31	AF113407/AF113445
<i>Absidia glauca</i>	CBS 102.08	AF113409/AF113447
<i>Absidia repens</i>	ATCC 14849	AF113410/AF113448
<i>Apophysomyces elegans</i>	CBS 476.78	AF113411/AF113449
<i>Apophysomyces elegans</i>	CBS 658.93	AF113412/AF113450
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	CBS 190.84	AF113421/AF113459
<i>Cunninghamella elegans</i>	CBS 151.80	AF113422/AF113460
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 277.49	AF113427/AF113467
<i>Mucor hiemalis</i>	CBS 201.65	AF113428/AF113468
<i>Mucor indicus</i>	CBS 226.29	AF113429/AF113469
<i>Mucor racemosus</i>	CBS 260.68	AF113430/AF113471
<i>Mucor ramosissimus</i>	CBS 135.65	AF113431/AF113472
<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 370.71	AF113432/AF113473
<i>Rhizomucor pusillus</i>	CBS 245.58	AF113434/AF113475
<i>Rhizopus azygosporus</i>	CBS 359.92	AF113436/AF113477
<i>Rhizopus microsporus</i>	CBS 308.87	AF113438/AF113479
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 146.90	AF113440/AF113481
<i>Rhizopus stolonifer</i>	ATCC 12938	AF113441/AF113482
<i>Saksenaia vasiformis</i>	ATCC 44101	AF113442/AF113483
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	CBS 440.59	X89437/AF113484
Non-Mucorales, Species		
<i>Alternaria alternata</i>		AF229504
<i>Aspergillus flavus</i>		JF824683
<i>Aspergillus fumigatus</i>		JN624279
<i>Candida albicans</i>		HQ876034
<i>Coprinopsis cinerea</i>		N939901
<i>Fusarium oxysporum</i>		JF824697
<i>Malassezia globosa</i>		EU192364
<i>Penicillium chrysogenum</i>		JN974021

8.4.2. 28S-System

Tabelle 46: Referenzstämme mit Zugangsnummern der Datenbank, 28S-System

Species	Nummer des Referenzstamms	Zugangsnummer, GenBank
Mucorales		
<i>Absidia coerulea</i>	CBS 104.08	HM849703
<i>Absidia glauca</i>	CBS 101.08	HM849705 T
<i>Absidia glauca</i>	CBS 115583	HM849706 IT
<i>Apophysomyces elegans</i>		AF113449
<i>Apophysomyces variabilis</i>	CBS 658.93	HM849695
<i>Cunninghamella echinulata</i>	CBS 156.28	HM849702
<i>Cunninghamella elegans</i>	CBS 167.53	HM849700
<i>Cunninghamella vesiculosa</i>	CBS 989.96	HM849693 T
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	CBS 429.75	GQ342903 NT
<i>Lichtheimia ornata</i>	CBS 291.66	GQ342946 T
<i>Lichtheimia ramosa</i>	CBS 582.65	GQ342909 NT
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 384.95	HM849679 T
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 195.68	HM849680 NT
<i>Mucor indicus</i>	CBS 226.29	HM849690 T
<i>Mucor ramosissimus</i>	CBS 135.65	HM849678 NT
<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 182.67	HM849717 T
<i>Rhizomucor pusillus</i>	CBS 354.68	HM849716 NT
<i>Rhizopus arrhizus</i>	CBS 112.07	HM849659 T
<i>Rhizopus microsporus</i>	CBS 357.93	HM849666 T
<i>Rhizopus stolonifer</i>	ARS 1477	AF113482
<i>Saksenaea oblongispora</i>	CBS 133.90	HM849694
<i>Saksenaea vasiformis</i>		AF113483
<i>Syncephalastrum monosporum</i>	CBS 567.91	HM849719 T
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	CBS 199.81	HM849718
Non-Mucorales		
<i>Alternaria alternata</i>		AB363761
<i>Aspergillus flavus</i>		AB363745
<i>Aspergillus fumigatus</i>		AY216670
<i>Aspergillus fumigatus</i>		JN874492
<i>Coprinopsis cinerea</i>		JQ45877
<i>Fusarium oxysporum</i>		EU683042
<i>Malassezia globosa</i>		JN687944
<i>Penicillium chrysogenum</i>		EU862182
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>		JQ266092

8.4.3. ITS2-System

Tabelle 47: Referenzstämme mit Zugangsnummern der Datenbank, ITS2-System

Species	Nummer des Referenzstamms	Zugangsnummer, GenBank
Mucorales		
<i>Absidia coerulea</i>		AF944868
<i>Absidia glauca</i>		AF944880
<i>Absidia repens</i>		AF944890
<i>Apophysomyces elegans</i>		FN556437
<i>Apophysomyces variabilis</i>		JN980700
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	CBS 693.68	AF254931
<i>Cunninghamella echinulata</i>	CBS 156.28	JN942997
<i>Cunninghamella elegans</i>	CBS 160.28	AF254928 NT
<i>Cunninghamella vesiculosa</i>	CBS 989.96	AF254943
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	CBS 429.75	GQ342878 NT
<i>Lichtheimia ornata</i>	CBS 291.66	GQ342891 T
<i>Lichtheimia ramosa</i>	CBS 582.65	GQ342874 NT
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 384.95	DQ119007 T
<i>Mucor circinelloides</i>	CBS 195.68	DQ118991 NT
<i>Mucor hiemalis</i>	CBS 201.65	DQ118992 NT
<i>Mucor indicus</i>	CBS 226.29	HM999956 T
<i>Mucor indicus</i>	CBS 260.68	DQ118996 T
<i>Mucor ramosissimus</i>	CBS 135.65	DQ118997 NT
<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 182.67	C2 HM999960 T
<i>Rhizomucor pusillus</i>	CBS 354.68	DQ119005 NT
<i>Rhizopus arrhizus</i>	CBS 112.07	DQ119031 T
<i>Rhizopus microsporus</i>	CBS 357.93	DQ119008 T
<i>Rhizopus schipperae</i>	CBS 138.95	HM999969 T
<i>Rhizopus stolonifer</i>		DQ641318 NT
<i>Saksenaea oblongispora</i>		FR687324
<i>Saksenaea vasiformis</i>		FR687332
<i>Syncephalastrum monosporum</i>	CBS 567.91	HM999974 T
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	CBS 213.78	HM999978 T
Non-Mucorales		
<i>Alternaria alternata</i>		JN618076
<i>Aspergillus flavus</i>		JQ029689
<i>Aspergillus fumigatus</i>		EF567971
<i>Candida albicans</i>		AF335963
<i>Fusarium oxysporum</i>		JF439473
<i>Malassezia globosa</i>		JN882325
<i>Penicillium marneffeii</i>		PECRGB
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>		JQ266092

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, in seinem Haus promovieren zu dürfen.

Mein Dank gilt an zweiter Stelle Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler, der es mir ermöglichte, die Arbeit in seinem Labor durchzuführen und mich mit seiner großen Zuverlässigkeit und Geduld immer wieder motivierte und unterstützte.

Besonders erwähnt sei mein Betreuer Daniel Goldenberger, der mich behutsam und geduldig an wissenschaftliches Arbeiten heranführte. Ich danke ihm für alles, was ich von ihm lernen durfte und seine ständige Bereitschaft, alle meine Fragen zu beantworten.

Des Weiteren danke ich dem kompletten Laborteam, insbesondere Denise Michel, das mich umgehend integriert hat und mir bei Problemen stets hilfreich zur Seite stand.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Mann bedanken, der mir in gewohnter Weise immer wieder Mut gemacht und so wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Lebenslauf

Name: Schmitt Friderike

Approbation als Ärztin: 11/2014