

Aus dem Institut für Tropenmedizin Tübingen
Abteilung Tropenmedizin und Humanparasitologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. J. Knobloch

Sensitivität von Färbemethoden und einer Nested-PCR
zum Nachweis von *Histoplasma capsulatum*
im Gewebe experimentell infizierter Mäuse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Friederike Ingeborg Charlotte Lerchner-Ernst, geb. Ernst
aus
Heidelberg

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Knobloch

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kaiserling

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
2 Material und Methoden	7
2.1 Gewebeproben	7
2.1.1 Tierversuche	7
2.1.2 Organe	7
2.1.3 Aufbereitung der Organe	8
2.2 Verwendete Reagenzien und Hersteller	10
2.3 Geräte und Reaktionsgefäße	12
2.4 Lösungen und Puffer	13
2.4.1 Lösungen für die Grocott-Färbung	13
2.4.2 Lösungen für die Immunhistologie	13
2.4.3 Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese	13
2.4.4 Puffer für die histologischen Färbungen	14
2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
2.5.1 Isolierung von DNA aus Paraffinschnitten	14
2.5.2 Primer und Reaktionsbedingungen der Nested-PCR	17
2.5.3 Agarosegel-Elektrophorese	19
2.5.4 Kontrollen in der Nested-PCR	20
2.6 Histologische Färbungen	21
2.6.1 Grocott-Färbung	21
2.6.2 Fluoreszenzfärbung	22
2.6.3 Immunhistologie	23
2.6.4 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	24
2.7 Mikroskopische Auswertung	25
2.8 Statistische Auswertung	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Ergebnisse der PCR-Kontrollen	28
3.2 Vergleich der Methoden	36
4 Diskussion	38

5 Zusammenfassung	45
6 Anhang	46
6.1 Häufig verwendete Abkürzungen	46
6.2 Abbildung 1	48
6.3 Abbildung 2	50
6.4 Abbildung 3	52
7 Literatur	54
8 Danksagung	58
9 Lebenslauf	59

1 Einleitung

Histoplasma capsulatum ist der Erreger der Histoplasmose, die weltweit vorkommt, aber in Amerika und Afrika endemisch ist (14). In den USA gibt es entlang der Flusstäler des Ohios und des Mississippi auffallend viele Krankheitsmanifestationen. Die Gründe dafür sind nicht bekannt, vermutet wird ein Zusammenhang zwischen dem gemäßigten Klima, der hohen Feuchtigkeit und den Bodenverhältnissen in diesem Gebiet (14, 37). Böden, die reich an Nitraten und Phosphaten sind, fördern das Wachstum der Pilze (14). Deshalb scheinen auch Vogel- und Fledermausausscheidungen eine wichtige Rolle in der Verbreitung der Histoplasmose zu spielen, da sie einerseits die Böden mit diesen Substanzen versetzen, andererseits häufig Träger des Pathogens sind.

H. capsulatum ist ein dimorpher Pilz der Familie *Onygenaceae*, deren Mitglieder durch einen temperaturabhängigen Wechsel der Wuchsform charakterisiert sind. Während sie bei Umgebungstemperaturen als Schimmel- bzw. Fadenpilze wachsen, Fruchtkörper ausbilden und infektiöse Konidien hervorbringen, wachsen diese Pilze als Hefezellen bei Temperaturen über 30 °C (33).

Der Mensch erwirbt die Infektion durch Inhalation von infektiösen Konidien (6), selten transkutan durch Verletzungen. Neben prädisponierenden Faktoren des Wirts wie z.B. einer Immunsuppression, entscheidet die Menge der inhalierten Sporen darüber, ob es zu einer Krankheitsmanifestation kommt. Seit der Entdeckung und Erstbeschreibung *H. capsulatum* durch Darling 1906 (10), kam es zu mehreren Ausbrüchen der Histoplasmose, nachdem Menschen hohen Mengen an Sporen ausgesetzt waren (35).

Das klinische Bild einer Erkrankung mit *H. capsulatum* reicht von der selbstlimitierenden, umschriebenen Lungeninfektion bis zur unbehandelt tödlich verlaufenden Systemerkrankung. Eine akute pulmonale Histoplasmose geht mit grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Myalgien, Dyspnoe und Hypoxie einher (5, 13). Ähnlich wie bei der Tuberkulose können Hefezellen von *H. capsulatum* intrazellulär persistieren und noch nach Jahren bei Änderung der Abwehrlage erneut wachsen und disseminieren. Ist die zellgesteuerte Immunabwehr beim Infizierten

gestört, kann es auch zum Zeitpunkt der Erstmanifestation zur disseminierten Histoplasmose kommen (17).

Dieses Krankheitsbild ist unter anderem durch hohes Fieber und Gewichtsverlust sowie eine Hepatosplenomegalie gekennzeichnet und kann von einer Koagulopathie begleitet sein (37). Der Mechanismus, der zur Dissemination führt, ist unklar (23).

Im weiteren Verlauf kann es zur Ausbildung einer Schocksymptomatik sowie zu einem Leber- und Nierenversagen kommen. Die Letalität der disseminierten Histoplasmose beträgt unbehandelt circa 80%, kann aber durch eine antimykotische Therapie auf unter 25% gesenkt werden (37). Die disseminierte Form der Histoplasmose kann bei Immunsupprimierten wie HIV-Infizierten (21) oder Organtransplantierten (36) vor allem in Endemiegebieten eine Bedrohung darstellen. In einigen Regionen der USA ist sie die häufigste Aids-definierende, opportunistische Infektion bei HIV-Infizierten (17).

Nach den Empfehlungen der amerikanischen Gesellschaft für Infektionskrankheiten (IDSA), ist bei asymptomatischer Lungeninfektion keine medikamentöse Behandlung erforderlich, da von einer Spontanheilung ausgegangen werden kann (37). Sobald Komplikationen wie eine schwere Hypoxie oder ein ARDS (akute respiratorische Insuffizienz) auftreten, ist eine intravenöse Gabe von Amphotericin B für bis zu 4 Wochen erforderlich. Im Anschluss ist eine Behandlung mit Itraconazol für 2-6 Monate indiziert (37). Die gleiche Therapie ist auch bei einer disseminierten Erkrankungsform angezeigt.

Für die Diagnose der Histoplasmose stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Als Goldstandard gilt nach wie vor die Anzucht von Pilzkulturen aus Blut, Knochenmark, Sputum oder Gewebe (19). Die Kolonien wachsen nur langsam heran und sind anspruchsvoll. Auf dem Blutagar entwickeln sich bei 37 °C weißliche bis bräunlich-cremefarbene Kolonien von Hefezellen (14). Die Identifizierung erfordert die Konversion von der Sprosspilzform zur Hefepilzform, um *H. capsulatum* von anderen saprophytischen Pilzen, die eine ähnliche mikroskopische Struktur aufweisen, unterscheiden zu können (14). Gewöhnlich erhält man innerhalb von 15-20 Tagen ein Resultat, es kann allerdings auch bis zu 8 Wochen dauern, bis ein Ergebnis vorliegt. Ein

negatives Ergebnis schließt dabei die Erkrankung nicht aus. *H. capsulatum* wird als so infektiös angesehen, dass die Anlage einer Kultur und die Transformation der Wuchsformen ein Labor der biologische Sicherheitsstufe III erfordert.

Außerhalb der endemischen Gebieten fehlt es häufig an Erfahrung, den Erreger anzuzüchten. Zudem wird die Diagnose nicht selten histologisch gestellt, also zu einem Zeitpunkt, an dem keine Kulturen mehr aus dem Untersuchungsmaterial angelegt werden können, da das Material bereits in Formalin fixiert wurde.

Eine Möglichkeit des histologischen Nachweises besteht in den pilzspezifischen Färbemethoden, zu denen insbesondere die Grocott-Färbung, die Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung), die Fungiquinal-Färbung und immunhistologische Methoden mit mono- oder polyklonalen Antikörpern gehören. Auch in der routinemäßig eingesetzten Giemsa-Färbung können die 2-4 µm großen, rundlichen, meist intrazellulär gelegenen Hefezellen erkannt werden. Je nach Färbemethode sind die Hefezellen verschieden gut gegen den Hintergrund abgrenzbar. Die Diagnose wird durch die unspezifische Anfärbung anderer Gewebsstrukturen, z.B. Erythrozyten bei der Grocott-Färbung, erschwert (33). Eine Artdiagnose kann mittels Färbemethoden nicht gestellt werden, da alle dimorphen Pilze mit den genannten Färbungen darstellbar sind, Antikörper kreuzreagieren und die Morphologie, insbesondere bei wenigen Hefezellen im Präparat, meist keine eindeutige Zuordnung erlaubt.

In der Diagnostik werden immundiagnostische Verfahren zum Nachweis von *H. capsulatum*-spezifischen Antikörpern im Serum und zum Nachweis von spezifischem Antigen in Blut, Urin, Liquor und anderen Körperflüssigkeiten eingesetzt (19). Histoplasmin, ein Sterilfiltrat einer 3-6 Monate alten Fadenpilzkultur von *H. capsulatum*, war bisher die Hauptantigenquelle für Antikörpertests wie z.B. dem Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). Mittels klassischer Immundiffusion wurde in Histoplasmin eine H- und eine M-Präzipitationsbande charakterisiert (14, 19). Antikörper gegen das H-Antigen können nur bei weniger als 25% der Patienten für ca. 6 Monate nachgewiesen werden. Dagegen sind Antikörper gegen das M-Antigen bei mehr als 75% der Patienten nachweisbar, und das für mehrere Jahre (19). Typischerweise gelingt der Nachweis spezifischer Antikörper aber erst in der dritten und vierten

Krankheitswoche. Zudem können die Antikörper viele Jahre persistieren, so dass der Nachweis bei Zweitinfektion oder Reaktivierung bei Immunsuppression wenig aussagekräftig ist. Bei immundefizienten Patienten kann der Antikörperanstieg auch vollständig fehlen. Der Antigennachweis hat bei einer disseminierten Histoplasmose eine Sensitivität von mehr als 90%, jedoch besteht auch hier eine Kreuzreaktivität zu anderen Erregern systemischer Mykosen (37). Weltweit wird diese Testung mehr oder weniger nur von einem darauf spezialisierten Labor durchgeführt. Kommerzielle Antigennachweisverfahren existieren nicht.

Eine in den letzten Jahren zunehmend eingesetzte Methode des Erregernachweises ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei wird versucht, mittels spezifischer Primer auch geringste Mengen an Mikroorganismen spezifischer DNA zu amplifizieren und über diesen Nachweis die Anwesenheit des Pathogens darzustellen. Zum Nachweis fungaler DNA sind mehrere Methoden entwickelt worden, deren Primer entweder universell sind, so dass möglichst viele Pilzspezies detektiert werden, oder so spezifisch sind, dass nur DNA einer Pilzart nachgewiesen wird. Die Nachweisgrenze kann verbessert werden, indem innerhalb des amplifizierten Genabschnittes eine kleinere Region mittels einer zweiten, so genannten Nested-PCR, amplifiziert wird. Bei Verwendung spezies-spezifischer Primer kann auch eine Artdifferenzierung vorgenommen werden (9).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Weg zur Diagnose einer Histoplasmose zu optimieren, die Sensitivität einer neuen Nested-PCR mit den in der Routine eingesetzten Färbemethoden zum Nachweis von *H. capsulatum* in Gewebeproben zu vergleichen und die Wertigkeit der molekularbiologischen Methode für die Routinediagnostik alternativ oder ergänzend zu histologischen Methoden zu bestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

2.1.1 Tierversuche

Im Rahmen eines Forschungsprojekts wurden im Labor von Dr. Graybill, Audie Murphy Veteran Affairs Hospital, San Antonio, Texas, 40 Institute of Cancer Research- (ICR-) Mäuse mit jeweils 8×10^3 Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) der Hefephase eines *H. capsulatum*-Laborstammes (Dr. R. Rinaldi Fungus Labor, University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA) intravenös infiziert.

Nach 1, 5, 11, 15 und 29 Tagen wurden jeweils 8 Tiere narkotisiert, EDTA-Blut durch Herzpunktion gewonnen sowie Lungen, Nieren, Milz und Leber entnommen. Die Organe wurden in zwei Teile geteilt und gewogen, ein Teil wurde im Flüssigstickstoff schockgefroren, der andere wurde in steriler 0,9% NaCl-Lösung homogenisiert, verdünnt und auf Blutagarplatten ausgestrichen. Nach 5-7 Tagen Bebrütung der Nährböden wurden die Pilzkolonien gezählt und anhand der Organgewichte die Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro mg Organ bestimmt.

In einem weiteren Versuch wurden immunkompetente Nu^+/Nu^- und immundefiziente Balb/c nu^+/nu^+ Mäuse (Nacktmäuse) mit 4×10^5 *H. capsulatum*-Hefezellen intravenös infiziert, z.T. mit Amphotericin B therapiert und nach verschiedenen Tagen getötet. Die Organe wurden entnommen und für Tage bis Wochen in Formalin gelagert.

2.1.2 Organe

Zwanzig Milzen von mit *H. capsulatum* infizierten ICR-Mäusen wurden verwendet. Die Organproben mit den Nummern 1, 4, 6 und 7 stammten von Mäusen, die am 1. Tag nach Infektion, die mit den Nummern 9, 10, 11 und 12, die am 5. Tag, die mit den Nummern 17, 20, 21, 24, die am 11. Tag, die mit den Nummern 25, 26, 27 und 29, die am 15. Tag und die mit den Nummern 33, 34, 35 und 36, die am 29. Tag nach Infektion getötet worden waren.

Sieben weitere Milzen und eine Lunge von immundefizienten, mit *H. capsulatum* infizierten Balb/c Mäusen wurden verwendet:

Milz und Lunge d29A und Milz d29B stammten von Balb/c nu^+/nu^+ Mäusen, die am 29. Tag, Milz d22A, d22B, d22C, d22D, d22E und d22F von Mäusen, die am 22. Tag nach Infektion getötet worden waren. Eine weitere Milzprobe (d22c) stammte von einer immunkompetenten nu^-/nu^+ Maus, die am 22. Tag getötet worden war.

Als Kontrollen wurden zwei Milzen von nicht infizierten Mäusen untersucht, die unter den gleichen Bedingungen wie im ersten Versuchsaufbau gehalten wurden (K1 und K2).

2.1.3 Aufbereitung der Organe

Die gefrorenen Organteile wurden aufgetaut und für 16 Stunden in Formalin eingelegt. Sie wurden in zwei circa gleich große Stücke geteilt, jeweils ein Stück wurde in eine Plastikkassette gelegt, die mit der Nummer des Organs bezeichnet worden war, in 85% Alkohol gestellt und über Nacht im Hypercenter bearbeitet, um sie in Paraffin einzubetten.

Die bereits formalinfixierten Organe wurden ebenfalls geteilt und vor der Bearbeitung im Einbettautomaten in Plastikkassetten gegeben.

Hypercenter (Einbettautomat)

Im Einbettautomaten wurden alle Präparationsschritte vom Auswaschen des Formalins bis zum Durchtränken mit Paraffin durchgeführt.

Nach Auswaschen der Fixierflüssigkeit wurden die Gewebstücke mit Hilfe einer langsam aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurde der Alkohol durch die Überführung der Präparate in ein Intermedium entfernt. Als Intermedium wurde Xylol gewählt, das sowohl mit Alkohol als auch Paraffin mischbar ist. Vom Intermedium aus wurde das Gewebe in eine mit Paraffin gesättigte Xylollösung gebracht (11).

Programm des Einbettautomaten

Schritt	Reagenz	Temperatur °C	Zeit	Abtropfzeit
1	85% Alkohol	42	30 Minuten	60 Sekunden
2	85% Alkohol	42	1 Stunde	120 Sekunden
3	96% Alkohol	42	1 Stunde	60 Sekunden
4	96% Alkohol	42	2 Stunden	120 Sekunden
5	100% Alkohol	42	1 Stunde	60 Sekunden
6	100% Alkohol	42	1 Stunde	60 Sekunden
7	100% Alkohol	42	1 Stunde	120 Sekunden
8	Xylol	42	1 Stunde	60 Sekunden
9	Xylol	42	1 Stunde	60 Sekunden
10	Xylol	42	1 Stunde	120 Sekunden
11	Paraplast	60	2 Stunden	60 Sekunden
12	Paraplast	60	3 Stunden	120 Sekunden

Ausgießen in Förmchen

Nach der Wahl einer geeigneten Stahl-Ausgussform, wurde am Paraffinspender etwas flüssiges Paraffin in die tiefste Aussparung der Form gegeben, die spätere Anschnittsfläche.

Das Präparat wurde eingelegt und justiert. Der Boden der Plastikkassette, in der das Präparat den Einbettautomaten passiert hatte, wurde fest in die Rillen gedrückt und bis zur Oberkante mit Paraffin gefüllt. Die gefüllte Form wurde 15 Minuten lang gekühlt, bis das Paraffin ausgehärtet war (11).

Herstellung der Schnitte

Am Rotationsmikrotom wurden die Paraffinschnitte für die verschiedenen Methoden mit unterschiedlicher Schichtdicke geschnitten:

- Grocott-Färbung, HE-Färbung, Fluoreszenzfärbung: 4 µm dick
- Immunhistologie: 2 µm dick
- PCR: 5 µm dick

Die Schnitte wurden den jeweiligen Methoden serienmäßig zugeteilt, um einer Bevorzugung einer Methode aufgrund einer fokalen Infektion im Organ vorzubeugen.

2.2 Verwendete Reagenzien und Hersteller

Für die Färbungen	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
BCG-Antikörper	DAKO A/S, Denmark
Borax	Merck, Darmstadt
BSA Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Chromsäure	Merck, Darmstadt
DMF N,N Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Evans blue	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Fungiquel	Labor Dr. Reinehr und Dr. Rembold, Kaldern
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Goldchlorid	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Levamisole	Sigma, Deisenhofen
Lichtgrün	Merck, Darmstadt
Methenamin	Merck, Darmstadt
Naphthol	Sigma, Deisenhofen
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
Paraffin	Sherwood medical, St. Louis, USA
Protein A	Vektor, Burlingame, CA, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Propandiol	Merck, Darmstadt

Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Natriumbisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Streptavidin	DAKO, Denmark
Xylol	Merck, Darmstadt

Für die PCR

ABI PRISM[®] DYE[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
 Agarose NEEO Ultra Qualität
 Ampli Taq[®] Polymerase
 Desoxynukleosid-Triphosphat Set (100 mM pro dNTP)
 Dextran
 DNA Molekulargewichtsmarker VIII
 EDTA
 Ethanol
 Ethidiumbromid
 Isopropanol
 Nuclex Extraktionskit[®]
 Primer
 Tris
 Xylol

Hersteller

Perkin Elmer, Foster City, USA

 Roth, Karlsruhe
 Perkin Elmer, Foster City, USA
 Promega, Madison, USA

 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Boehringer, Mannheim
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Merck, Darmstadt
 Mediagnost, Tübingen
 Roth, Karlsruhe
 Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Merck, Darmstadt

2.3 Geräte und Reaktionsgefäße

Geräte für Färbungen

Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Cover Plates	Shandon, Frankfurt
Entparaffinierungs- und Färbeapparat	Varistain 24-4, Shandon, Frankfurt
Eindeckapparat	Promounter RCM 90, Medite, Burgdorf
Hypercenter	Shandon, Frankfurt
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberhochen
Paraffinspender	Vogel, Gießen
Rotationsmikrotom	Reichert-Jung 2040, Nussloch
Kassetten	Langenbrinck, Emmendingen

Für die PCR

Gelkammern: horizontal	Peqlab, Erlangen Stratagene, La Jolla, CA, USA MWG Biotech, Ebersberg
Netzgerät	Power pac 200, BioRad, München
Thermozykler:	
Primus 96 Plus	MWG Biotech, Ebersberg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortexer IKA® MS1	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge: Biofuge 13	Heraeus, Wiesloch

Computer zur Sequenzauswertung

MacIntosh Quadra 650
Power MacIntosh G3

Sequenziergeräte

373A, ABI PRISM™	
373, ABI PRISM™ mit Genetic Analyzer 310	Perkin Elmer, Foster City, USA

Reaktionsgefäße

PCR Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

2.4 Lösungen und Puffer

2.4.1 Lösungen für die Grocott-Färbung

Methenamin-Silbernitrat-Lösung

- Mischen von 5,0 ml 5% Silbernitrat-Lösung und 100 ml 3% Methenamin-Lösung ergibt die Basislösung
- Mischen von 25,0 ml Basis-Lösung, 25,0 ml destilliertem Wasser und 2,0 ml 5% Borax-Lösung ergibt die Arbeitslösung

2.4.2 Lösungen für die Immunhistologie (mit BCG-Antikörper)

Entwicklerlösungen:

Lösung I: 125 mg Naphthol, 1,5 ml DMF

Lösung II: 500 µl 5 % Neufuchsinlösung, 1250 µl Natriumnitritlösung

Lösung III: 62,5 ml Propandiol, 175,0 ml Aqua tridest, 100,0 mg Levamisol

Herstellung der Silbernitratlösung

- Mischen der Inhaltsstoffe von Lösung III, auffüllen mit 250 ml destilliertem Wasser
- Unter Abzug lösen von 125 mg Naphthol in 1,5 ml DMF für Lösung I
- Mischen der Inhaltsstoffe von Lösung II und Schütteln für 1 Minute
- Zusammengeben von Lösung II mit Lösung III, gefogt von Lösung I
- Einstellen des pH-Wertes auf einen Wert von 8,7

2.4.3 Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese

5 x Dextranpuffer

40% Glycerin

0,4% Blue Dextran

10 mM EDTA

5 x Probenladepuffer (BPB-Mix)

50 mM Tris, pH 7,6

50 mM EDTA

0,5% SDS

0,1% BPS

TAE-Puffer (50 x)

2 M Tris-HCl, pH 7,5

1 M Essigsäure (100%)

0,1 M EDTA

2.4.4 Puffer für die Histologischen Färbungen**TBS-Puffer (Tris buffered saline)**

120,20 g Tris

170,40 g NaCl

500 ml Aqua destillata

pH-Wert 7,6

PBS-Puffer (Phosphate buffered saline)1,43 g Na₂HPO₄0,20 g KH₂PO₄

3,50 g NaCl

500 ml Aqua destillata

pH-Wert 7,2

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**2.5.1 Isolierung von DNA aus Paraffinschnitten**

Zur Entparaffinierung der Gewebsschnitte wurden die Schnitte mit Xylol und Ethanol behandelt. Zur Auflösung der Gewebsstrukturen und Inhibition von DNAsen wurde Proteinase K zugegeben. Nach einer längeren Inkubationszeit wurden die Pilzzellwände durch Gefrier- und Kochzyklen rupturiert. Um die DNA zu isolieren, wurde Silicagel

eingesetzt, das die DNA absorbiert. Mit verschiedenen Lösungen wurden die Proteine gefällt und entfernt. Anschließend wurde die an Silicagel gebundene DNA in destilliertem Wasser gelöst.

Zur Reduktion möglicher Kontaminationen wurden die Arbeitsschritte unter der Sterilbank durchgeführt. Es wurde ein kommerzieller Extraktionskit (Nuklex-Kit) verwendet.

DNA-Extraktionsprotokoll

- Zugabe von 1000 µl Xylol zu 2 Paraffinschnitten in einem Eppendorfgefäß (1,5 ml)
- Inkubation im Schüttler für 5 Minuten bei Raumtemperatur
- Zentrifugation bei 13000 rpm für 3 Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge
- Überstand abpipettieren und verwerfen
- Zugabe von 1000 µl Ethanol (90%)
- Zentrifugieren und verwerfen des Überstandes wie oben
- Wiederholung des Zentrifugationsschrittes nach nochmaliger Zugabe von 1000 µl Ethanol (90%)
- Trocknen in einer Speed-Vacuum Zentrifuge für circa 25 Minuten zur Entfernung von Ethanolresten
- Zugabe von 100 µl sterilem Wasser, kurzes Mischen
- Zugabe von 25 µl Proteinase K (Endkonzentration 1mg/ml), mischen, Inkubation für 3 Stunden im Schüttler bei 55 °C
- Kochen der Proben im Wasserbad für 5 Minuten, einfrieren der Proben für 30 Sekunden in Flüssigstickstoff
- 2 Minuten kochen im Wasserbad, einfrieren im Flüssigstickstoff für 30 Sekunden
- 2 Minuten kochen im Wasserbad, einfrieren im Flüssigstickstoff für 30 Sekunden
- Zuletzt 5 Minuten kochen im Wasserbad

Nuklexkit entsprechend dem Protokoll des Herstellers

- Zugabe von 900 µl Lysepuffer (Lösung A)
- Gründliche Mischung der Silica-Lösung
- Zugabe von 10 µl Silica-Lösung
- 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
- Zentrifugation für 30 Sekunden bei 12000 rpm
- Vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes
- Resuspendieren des Pellets in 900 µl Waschlösung B
- Zentrifugation für 30 Sekunden bei 12000 rpm
- Vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes
- Resuspendierung des Pellets in 70% Ethanol (gekühlt bei -20 °C)
- Zentrifugation des Probenansatzes für 30 Sekunden bei 12000 rpm
- Vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes
- Resuspendierung des Pellets in 70% Ethanol (gekühlt bei -20 °C)
- Zentrifugation des Probenansatzes für 30 Sekunden bei 12000 rpm
- Vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes
- Resuspendierung des Pellets in Aceton (gekühlt bei -20 °C)
- Zentrifugation des Probenansatzes für 30 Sekunden bei 12000 rpm
- Vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes
- Trocknen des Pellets im Schüttler bei 56 °C und offenem Reaktionsgefäß für 10 Minuten
- Wiederaufnahme des Pellets in 100 µl sterilem Wasser
- Inkubation bei 56 °C für 10 Minuten
- Zentrifugation bei 13000 rpm für 4 Minuten
- Überführung von 75 µl des Überstandes in ein neues Gefäß

Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde der Versuchsansatz für die PCR in einem gesonderten Laborraum, getrennt von der Extraktion, pipettiert.

2.5.2 Primer und Reaktionsbedingungen der Nested-PCR

Eine Nested-PCR basiert auf dem Prinzip zweier ineinander verschachtelter Polymerase-Kettenreaktionen. Aus der Zielsequenz der ersten PCR wird in der zweiten, so genannten Nested-PCR, ein Teilstück der ersten PCR-Produkte amplifiziert. Dieses Vorgehen erhöht die Sensitivität und Spezifität der Methode, birgt jedoch die Gefahr von Kontaminationen. Es wurde eine zuvor beschriebene *H. capsulatum*-PCR verwendet (2). Die äußeren Primer F1 und F2 amplifizieren ein 429 bp Segment der konservierten Region des 18S ribosomalen RNA-Gens. Bei *H. capsulatum* (X58572) liegt die Region zwischen den Positionen 576 (-594 für den 1. Primer) und Primer II: 985-1004. Das innere Primerpaar H1 und H2 amplifiziert ein 230 bp langes Segment. Dabei bindet der erste Primer an die Positionen 643-666 und der zweite an die Positionen 873-849 der 18S ribosomalen DNA.

1. PCR

Primer

F1: 5'-GTT AAA AAG CTC GTA GTT G-3'

F2: 5'-TCC CTA GTC GGC ATA GTT TA-3'

PCR-Ansatz (50 µl)

Reaktionsansatz	Volumen	Endkonzentration
10 x Puffer (<i>Perkin Elmer</i>) 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 500 mM KCl	5 µl	1 x 10,0 mM 50,0 mM
MgCl ₂ (25 mM)	5,0 µl	2,5 mM
dNTP-Mix (5 mM von jedem dNTP)	1,0 µl	100,0 µM
Primer F1 (50 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µM
Primer F2 (50 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µM
Ampli Taq [®] DNA-Polymerase, (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
DNA-Extrakt	10,0 µl	
H ₂ O _{deion.}	26,7 µl	

Temperaturprofil

Vorbehandlung:	94 °C	5 Minuten
3-Schritt-Zyklus:		
Denaturierung:	94 °C	30 Sekunden
Hybridisierung:	50 °C	30 Sekunden
Elongation:	72 °C	60 Sekunden
Zyklenanzahl:	35	
Extension	72 °C	5 Minuten
Amplifikat:	429 bp	

Nested-PCR*Primer***H1: 5'-GCC GGA CCT TTC CTC CTG GGG AGC-3'****H2: 5'-CAA GAA TTT CAC CTC TGA CAG CCG A-3'****PCR-Ansatz (50 µl)**

Reaktionsansatz	Volumen	Endkonzentration
10 x Puffer	5,0 µl	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	5,0 µl	2,5 mM
dNTP-Mix (5 mM von jedem dNTP)	1,0 µl	100 µM
Primer H1 (50 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µM
Primer H2 (50 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µM
Ampli Taq [®] DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
Suspension der 1. PCR	1,0 µl	
H ₂ O deion.	35,7 µl	

Temperaturprofil

Vorbehandlung:	94 °C	5 Minuten
2-Schritt-Zyklus		
Denaturierung:	94 °C	30 Sekunden
Elongation:	72 °C	60 Sekunden

Zyklenanzahl: 30
Extension: 72 °C 5 Minuten
Amplifikat: 231 bp

2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können in einem Agarosegel durch Anlegen einer elektrischen Spannung nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Färbung mit Ethidiumbromid (EtBr) werden sie mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Herstellung des Gels

- Kochen der Agarlösung (1,5%, hergestellt mit 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle, bis Agarose ganz gelöst ist)
- Zugabe von 10 µl EtBr (0,1% in H₂O bidest) zu 100 µl Agaroselösung
- Gießen der Lösung in die Gelkammer
- Einsetzen der Probenkämme

Zur Analyse von PCR-Amplifikationsprodukten

- Mischen von 10 µl der PCR-Suspension mit 2,5 µl 5 x Probenladepuffer
- Einpipettieren der Proben in die Probenaschen des Gels
- Anlegen einer Spannung von 80-120 V
- Nach 30-90 Minuten stoppen
- Auswerten und fotografieren des Gels unter UV-Licht bei 312 nm

Längenbestimmung

Neben den DNA-Fragmenten wurde ein bekannter Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Durch Vergleich mit den Fragmenten des Standards wurde die Größe der Amplifikate bestimmt.

2.5.4 Kontrollen in der Nested-PCR

Zur Detektion von Kontaminationen wurde ein Leerwert mitgeführt, der statt 10 µl DNA 10 µl H₂O_{deion.} beinhalten. Da in der Probe keine amplifizierbare Zielsequenz enthalten war, sollte der Leerwert negativ sein. Ein positiver Leerwert würde darauf hindeuten, dass entweder eine Verunreinigung der Reagenzien mit der Zielsequenz oder eine Kontamination durch exogene DNA vorliegen würde.

Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen der eingesetzten Primer mit DNA des Wirtsorganismus wurden DNA-Extrakte aus Organen nicht infizierter Mäuse eingesetzt (Negativkontrolle).

Der Einsatz geringer Mengen genomischer DNA aus einer Hefezellsuspension von *H. capsulatum* kontrollierte die Reaktionsbedingungen (Positivkontrolle).

Ein negatives Ergebnis deutete auf Fehler im Reaktionsansatz, z.B. das Fehlen von Reaktionspartnern hin, und hätte eine Wiederholung des Gesamtansatzes zur Folge. Zur Überprüfung eines negativen PCR-Resultates, das durch die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren bedingt sein kann, wurden Inhibitorenkontrollen durchgeführt. Die Proben wurden nach dem Schema der Nested-PCR gehandhabt, in der ersten PCR wurden dem PCR-Ansatz jeweils 8 µl Extrakt und 2 µl der Positivkontrolllösung hinzugefügt.

Für die Sequenzierung wurden die Produkte der Nested-PCR mit dem QIAquick PCR Purification Kit zunächst gereinigt. Er baut darauf auf, dass DNA an Silica-Gel bindet. Die automatische Sequenzierung wurde mit dem ABI PRISM Big Dye Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und PCR-Primern nach Empfehlung der Hersteller durchgeführt und im automatischen ABI 373 DNA Sequenzierer analysiert. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe der Sequence Navigator Software (Applied Biosystems). Die bearbeiteten DNA-Sequenzen wurden unter Verwendung des Programmes *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) auf Homologien zu bisher bekannten Nukleotidsequenzen untersucht.

2.6 Histologische Färbungen

Entparaffinierung

Nach völligem Trocknen auf Wärmeplatten wurden die Paraffinschnitte auf Objektträgern für mindestens eine Stunde im Wärmeofen bei 60 °C belassen. Anschließend kamen die Paraffinschnitte zum Herauslösen des Paraffins in Xylol und wurden danach durch eine absteigende Alkoholreihe geführt.

Programm zur Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Schritt	Reagenz	Zeit
1	Xylol	2 Minuten
2	Xylol	2 Minuten
3	Xylol	2 Minuten
4	Xylol	2 Minuten
5	100% Alkohol	4 Minuten
6	100% Alkohol	4 Minuten
7	96% Alkohol	4 Minuten
8	96% Alkohol	4 Minuten
9	70% Alkohol	4 Minuten
10	Aqua destillata	30 Sekunden

2.6.1 Grocott-Färbung

Entwickelt wurde die Grocott-Färbung als histochemischer Test für die Pilzbestandteile Glykogen und Mucin (18). Durch die Behandlung mit Chromsäure entstehen Aldehydgruppen. Diese werden durch die folgende Reduktion des Methenamin-Silbernitrat-Komplexes detektiert. Die Pilzbestandteile werden schwarz angefärbt und heben sich deutlich gegen den blassgrünen Hintergrund hervor.

Die Grocott-Färbung wurde nach Literaturvorschrift durchgeführt (25). Die Färbemethode nahm ohne die Entparaffinierung vier Stunden in Anspruch. Davon waren 2,5 Stunden Inkubationszeit. Es wurden jeweils 15 Objektträger in einem Arbeitsgang gefärbt.

Färbvorschrift

- Entparaffinierung der Paraffinschnitte auf Objektträgern
- Oxidation in 4%-iger Chromsäurelösung innerhalb einer Stunde
- Spülung mit Leitungswasser für einige Sekunden
- Zugabe von 1%-iger Natriumbisulfit Lösung für eine Minute zur Entfernung der restlichen Chromsäure
- Waschen mit Leitungswasser für 5 Minuten
- Drei- bis viermalige Spülung mit destilliertem Wasser
- Zugabe der frisch zubereiteten Methenamin-Silbernitrat-Lösung
- Circa 80 Minuten Inkubation im Wärmofen bei 60 °C (Zielfarbe der Schnitte: gelbbraun)
- Gründliches Waschen mit destilliertem Wasser
- Tönung der Schnitte in 0,1 % Goldchlorid-Lösung für 3 Minuten
- Mehrere Waschgänge mit destilliertem Wasser
- Entfernung des restlichen nicht reduzierten Silbers durch Stellen der Objektträger in 2%-iger Natriumthiosulfat-Lösung für 3 Minuten
- Sorgfältiges Waschen mit Leitungswasser
- Gegenfärbung mit unverdünntem Lichtgrün für 30 Sekunden
- Dehydration durch aufeinanderfolgendes Eintauchen in 95% Alkohol, absolutem Alkohol und Xylol

Die fertigen Schnitte wurden maschinell eingedeckelt.

2.6.2 Fluoreszenzfärbung

Die Fluoreszenzfärbung wurde nach den Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Verwendet wurde die applikationsfertige Lösung Fungiqua A, ein Stilbenfarbstoff bestehend aus 4,4'-bis {(4-(3-sulfoanilino)-6-bis(2-hydroxyethyl)amino-1,3,5-triazin-2-yl)amino}stilben-2,2'-disulfosäuretetratrium-Salz in PBS-Puffer.

Fluoreszenzfarbstoffe binden an die Zellelemente Glucan und Chitin (27, 28). Die Pilzwände erscheinen unter UV-Licht blau bis grünlich fluoreszierend. Zur Minderung der Hintergrundfluoreszenz wurde mit dem Farbstoff Evans-Blue gegengefärbt. Die

Fluoreszenzfärbung von 20 Objektträgern wurde in 30 Minuten durchgeführt, davon waren 20 Minuten Inkubationszeit.

Färbevorschrift

- Entparaffinierung der Gewebsschnitte
- Überschichtung der Schnitte mit jeweils einem Tropfen Fungiqua
- Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur
- Spülung mit PBS-Puffer
- Gegenfärbung mit Evans-Blue

2.6.3 Immunhistologie

Die Methode wurde entsprechend dem Protokoll der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Für die Durchführung der Methode wurden Cover Plates verwendet, die optimale Voraussetzungen für die Bildung feuchter Kammern bieten.

Die Immunhistologie basiert auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Im ersten Schritt wird BSA (Rinderserumalbumin) auf die Probe aufgetragen, um unspezifische Bindungsstellen für den folgenden Antikörper zu blockieren. Im zweiten Schritt bindet der polyklonale, gegen *Mycobacterium bovis* gerichtete Antikörper an die Oberflächenantigene von Pilzzellen. Protein A, das danach zugegeben wird, bindet an die Fc-Region von Immunglobulinen und das folgende Streptavidin bindet an Protein A. Beim Vorliegen von Pilzzellen entsteht ein Antigen-Antikörper-Protein A-Streptavidin-Komplex. Das Streptavidin ist an eine Peroxidase konjugiert. Bei Zugabe von Chromogenen (Neufuchsinlösung) kommt es zu einem Farbniederschlag an der Peroxidase, so dass die lokale Immunreaktion sichtbar gemacht wird (11). Die Pilze erscheinen rötlich.

Pro Färbung wurden jeweils 20 Objektträger gefärbt. In 2 Stunden 45 Minuten wurden 20 Objektträger mit entparaffinierten Gewebeproben gefärbt. Die Inkubationszeiten betragen insgesamt 2 Stunden.

Färbevorschrift

- Entparaffinierung der Gewebsschnitte
- Einlage in Cover-Plates
- Auftragen von 100 µl Proteinase K zur Inaktivierung endogener Peroxidasen (Endkonzentration 0,02 mg/ml) pro Schnitt
- 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur
- Spülen mit PBS-Spülpuffer.
- Auftragen von BSA zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 10 Minuten
- Zugabe des in TBS Puffer 1:1000 verdünnten Antikörpers
- 40-minütige Inkubation bei Raumtemperatur
- Mehrmalige sorgfältige Spülung mit PBS-Puffer
- 30-minütige Inkubation mit Protein A bei Raumtemperatur
- Erneutes Spülen mit Puffer
- Auftragen von Streptavidin
- Spülen mit Puffer

Entwicklung:

- Filtration der Entwicklerlösung
- Auftragung auf die Paraffinschnitte
- Inkubationszeit für 15 Minuten bei Raumtemperatur
- Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für eine Minute
- Spülung mit sterilem Wasser
- Bläuung mit Leitungswasser
- Eindeckelung per Hand mit Glyceringelatine

2.6.4 Hämatoxylin-Eosin- (HE)-Färbung

Für die HE-Färbung wurden die auf Objektträger aufgezogenen und getrockneten Organschnitte im Färbeautomaten zunächst entparaffiniert und anschließend anhand des folgenden Programmes gefärbt. Pro Durchgang liefen 20 Objektträger durch den Automaten. Die HE-Färbung nahm 1 Stunde in Anspruch.

Programm der HE-Färbung

Schritt	Reagenz	Inkubationszeit
1	Hämalaun	10 Minuten
2	Aqua destillata	30 Sekunden
3	HCl Alkohol	1 Sekunde
4	Leitungswasser warm	1 Minute
5	Leitungswasser warm	1 Minute
6	80% Alkohol	1 Minute
7	Eosin	6 Sekunden
8	80% Alkohol	1 Minute
9	96% Alkohol	2 Minuten
10	96% Alkohol	2 Minuten
11	100% Alkohol	2 Minuten
12	100% Alkohol	2 Minuten
13	Xylol	2 Minuten
14	Xylol	2 Minuten

2.7 Mikroskopische Auswertung

Bei allen Färbemethoden wurden die Organschnitte vollständig, Blickfeld für Blickfeld durchgemustert.

Die mit der HE-Färbung, Grocott-Färbung und Immunhistologie gefärbten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung betrachtet. Zur sicheren Identifizierung wurde die 1000-fache Vergrößerung verwendet. Die Fluoreszenzfärbung wurde unter einem Auflichtfluoreszenzmikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 390-420 nm und einem Fluoreszenzfilter bei 450 nm ausgewertet. Im Blaubereich fluoreszierten die Pilze gelbgrün, im UV-Bereich weißblau. Folgende Bewertungsskala wurde zur Beurteilung der Pilzdichte pro Gewebsschnitt angewendet:

- Pilzstrukturen in jedem 6.-10. Gesichtsfeld bzw. mindestens ein Pilz pro Schnitt: +
- Pilzstrukturen in jedem 2.-6. Gesichtsfeld: ++
- Pilzstrukturen in jedem Gesichtsfeld: +++

Von jedem Organ wurden pro Färbemethode vier Gewebeschnitte mikroskopiert und das semiquantitative Ergebnis jedes Gewebsschnittes dokumentiert.

2.8 Statistische Auswertung

Ein Schnitt wurde als positiv gewertet, wenn wenigstens eine Zelle mit der typischen Morphologie von *H. capsulatum* im gesamten Präparat entdeckt worden war. Eine Milz wurde als positiv befundet, wenn durch eine Färbemethode wenigstens zwei der vier vollständig durchgemusterten Schnitte positiv waren.

Die PCR galt als positiv, wenn ein Produkt der erwarteten Größe im Gel dargestellt werden konnte. Eine Milz wurde als PCR-positiv befundet, wenn wenigstens einer der beiden Versuchsansätze positiv waren. Die Parameter einer logistischen Regression wurden mithilfe der Maximum-Likelihood-Methode geschätzt und mit dem Likelihood-Quotienten verglichen.

3. Ergebnisse

Tabelle 1

Nachweis von *Histoplasma capsulatum* mittels spezifischer PCR in Organen experimentell infizierter Mäuse

Nr.	KBE/mg	Schnitt 1+2	Schnitt 3+4
Milz K1	0	-	-
Milz K2	0	-	-
Milz 33	0	-	-
Milz 34	0	-	-
Milz 35	0	-	-
Milz 36	0	-	-
Milz 29	0,2	-	-
Milz 27	0,8	-	-
Milz 7	1,2	-	+
Milz 25	2,6	-	-
Milz 6	3,4	+	+
Milz 17	4,9	-	+
Milz 26	5,8	-	+
Milz 1	6,5	+	-
Milz 4	8,4	-	+
Milz 20	10	-	-
Milz 21	12	-	-
Milz 24	27	+	+
Milz d22c	100	+	+
Milz 10	127	+	+
Milz 9	138	+	+
Milz 11	187	+	+
Milz d22D	600	+	+
Milz d22E	662	+	+
Milz 12	716	+	+

Milz d22F	1100	+	+
Milz d29A	6500	+	+
Lunge d29A	10000	+	+
Milz d29B	10312	+	+
Milz d22C	>10000	+	+

Das Ergebnis wurde als positiv gewertet, wenn einer der beiden Versuchsansätze (1+2 oder 3+4) positiv war. Die Zeilen, in denen einer von zwei Versuchsansätzen positiv war, wurden hellgrau unterlegt, die Zeilen, in denen beide Versuchsansätze positiv waren, dunkelgrau. Bei negativen Ergebnissen beider Versuchsansätze wurde die Zeile nicht farbig unterlegt. KBE/mg bedeutet Kolonie bildende Einheiten pro mg Organ in der Pilzkultur.

3.1 Ergebnisse der PCR-Kontrollen

In der Nested-PCR wurden stets Leerwert-, Positiv-, Negativ- und Inhibitorenkontrollen mitgeführt. In allen Versuchsreihen, von denen die oben aufgeführten Ergebnisse stammen, waren Leerwert- und Negativ- sowie die Inhibitorenkontrollen negativ, die Positivkontrolle war positiv. Stichprobenartig wurden einzelne Amplifikate zusätzlich sequenziert.

Tabelle 2

Nachweis von *Histoplasma capsulatum* mittels Grocott-Färbung in Organen experimentell infizierter Mäuse

Nr.	KBE/mg	Schnitt 1	Schnitt 2	Schnitt 3	Schnitt 4
Milz K1	0	-	-	-	-
Milz K2	0	-	-	-	-
Milz 33	0	-	-	-	-
Milz 34	0	-	-	-	-
Milz 35	0	-	-	-	-
Milz 36	0	-	-	-	-
Milz 29	0,2	-	-	-	-
Milz 27	0,8	-	+	-	-
Milz 7	1,2	-	-	-	-
Milz 25	2,6	-	-	+	-
Milz 6	3,4	+	-	-	-
Milz 17	4,9	-	-	+	-
Milz 26	5,8	+	-	-	+
Milz 1	6,5	-	-	+	-
Milz 4	8,4	-	-	+	+
Milz 20	10	-	-	-	-
Milz 21	12	+	-	-	-
Milz 24	27	+	-	-	+
Milz d22c	100	-	-	+	+
Milz 10	127	+	+	-	-
Milz 9	138	+	+	+	+
Milz 11	187	++	++	++	++
Milz d22D	600	+	+	+	+
Milz d22E	662	+	++	+	+
Milz 12	716	++	+	++	+
Milz d22F	1100	++	++	++	+
Milz d29A	6500	+++	+++	+++	+++

Lunge d29A	10000	+++	+++	++	++
Milz d29B	10312	+++	+++	+++	+++
Milz d22C	>10000	+++	+++	+++	+++

Die Plus- und Minuszeichen stehen für folgende Ergebnisse bei der mikroskopischen Auswertung: waren Pilzstrukturen in jedem 6.-10. Gesichtsfeld bzw. fand sich mindestens ein Pilz pro Schnitt, ergab dies ein Pluszeichen, bei Pilzstrukturen in jedem 2.-6. Gesichtsfeld ergab dies zwei Pluszeichen, fanden sich in jedem Gesichtsfeld Pilzstrukturen, ergab dies drei Pluszeichen, während ein Minuszeichen signalisiert, dass keine Pilzzelle im gesamten Schnitt gefunden werden konnte.

Bei positiven Ergebnissen aller vier Schnitte wurde die Zeile dunkelgrau unterlegt. Bei positiven Ergebnissen von zwei Schnitten wurde die Zeile hellgrau unterlegt. Bei negativen Ergebnissen aller vier Schnitte oder nur einem positiven Schnitt wurde die Zeile nicht farbig unterlegt. KBE/mg bedeutet Kolonie bildende Einheiten pro mg Organ in der Pilzkultur.

Tabelle 3

Nachweis von *Histoplasma capsulatum* mittels Fluoreszenzfärbung in Organen experimentell infizierter Mäuse

Nr.	KBE/mg	Schnitt 1	Schnitt 2	Schnitt 3	Schnitt 4
Milz K1	0	-	-	-	-
Milz K2	0	-	-	-	-
Milz 33	0	-	-	-	-
Milz 34	0	-	-	-	-
Milz 35	0	-	-	-	-
Milz 36	0	-	-	-	-
Milz 29	0,2	-	-	-	-
Milz 27	0,8	-	-	-	-
Milz 7	1,2	-	-	-	-
Milz 25	2,6	-	-	-	-
Milz 6	3,4	-	-	-	-
Milz 17	4,9	+	-	-	+
Milz 26	5,8	-	-	-	-
Milz 1	6,5	-	-	-	-
Milz 4	8,4	-	-	-	-
Milz 20	10	-	-	-	-
Milz 21	12	-	-	-	-
Milz 24	27	-	-	-	-
Milz d22c	100	-	-	+	+
Milz 10	127	+	-	+	-
Milz 9	138	-	+	+	-
Milz 11	187	+	++	++	+
Milz d22D	600	+++	++	++	++
Milz d22E	662	++	+	++	++
Milz 12	716	+	+	+	++
Milz d22F	1100	++	++	+	++
Milz d29A	6500	+++	+++	+++	+++

Lunge	10000	++	++	++	+++
Milz d29B	10312	+++	+++	+++	+++
Milz d22C	>10000	+++	+++	+++	+++

Die Plus- und Minuszeichen stehen für folgende Ergebnisse bei der mikroskopischen Auswertung: waren Pilzstrukturen in jedem 6.-10. Gesichtsfeld bzw. fand sich mindestens ein Pilz pro Schnitt, ergab dies ein Pluszeichen, bei Pilzstrukturen in jedem 2.-6. Gesichtsfeld ergab dies zwei Pluszeichen, fanden sich in jedem Gesichtsfeld Pilzstrukturen, ergab dies drei Pluszeichen, während ein Minuszeichen signalisiert, dass keine Pilzzelle im gesamten Schnitt gefunden werden konnte.

Bei positiven Ergebnissen aller vier Schnitte wurde die Zeile dunkelgrau unterlegt. Bei positiven Ergebnissen von zwei Schnitten wurde die Zeile hellgrau unterlegt. Bei negativen Ergebnissen aller vier Schnitte oder nur einem positiven Schnitt wurde die Zeile nicht farbig unterlegt. KBE/mg bedeutet Kolonie bildende Einheiten pro mg Organ in der Pilzkultur.

Tabelle 4

Nachweis von *Histoplasma capsulatum* mittels Immunhistologie in Organen experimentell infizierter Mäuse

Nr	KBE/mg	Schnitt 1	Schnitt 2	Schnitt 3	Schnitt 4
Milz K1	0	-	-	-	-
Milz K2	0	-	-	-	-
Milz 33	0	-	-	-	-
Milz 34	0	-	-	-	-
Milz 35	0	-	-	-	-
Milz 36	0	-	-	-	-
Milz 29	0,2	-	-	-	-
Milz 27	0,8	-	-	-	-
Milz 7	1,2	-	-	-	-
Milz 25	2,6	-	-	-	-
Milz 6	3,4	-	-	-	-
Milz 17	4,9	-	-	-	-
Milz 26	5,8	-	-	+	-
Milz 1	6,5	-	-	-	-
Milz 4	8,4	-	-	-	-
Milz 20	10	-	-	-	-
Milz 21	12	-	-	-	+
Milz 24	27	-	-	-	-
Milz d22c	100	+	-	-	-
Milz 10	127	-	-	-	-
Milz 9	138	+	-	-	-
Milz 11	187	+	-	-	+
Milz d22D	600	+	+	+	+
Milz d22E	662	+	+	+	+
Milz 12	716	-	+	-	+
Milz d22F	1100	+	+	+	+
Milz d29A	6500	+	++	++	+

Lunge	10000	++	++	++	+
Milz d29B	10312	++	+++	++	+++
Milz d22C	>10000	++	++	++	++

Die Plus- und Minuszeichen stehen für folgende Ergebnisse bei der mikroskopischen Auswertung: waren Pilzstrukturen in jedem 6.-10. Gesichtsfeld bzw. fand sich mindestens ein Pilz pro Schnitt, ergab dies ein Pluszeichen, bei Pilzstrukturen in jedem 2.-6. Gesichtsfeld ergab dies zwei Pluszeichen, fanden sich in jedem Gesichtsfeld Pilzstrukturen, ergab dies drei Pluszeichen, während ein Minuszeichen signalisiert, dass keine Pilzzelle im gesamten Schnitt gefunden werden konnte.

Bei positiven Ergebnissen aller vier Schnitte wurde die Zeile dunkelgrau unterlegt. Bei positiven Ergebnissen von zwei Schnitten wurde die Zeile hellgrau unterlegt. Bei negativen Ergebnissen aller vier Schnitte oder nur einem positiven Schnitt wurde die Zeile nicht farbig unterlegt. KBE/mg bedeutet Kolonie bildende Einheiten pro mg Organ in der Pilzkultur.

Tabelle 5

Nachweis von *Histoplasma capsulatum* mittels HE-Färbung in Organen experimentell infizierter Mäuse

Nr.	KBE/mg	Schnitt 1	Schnitt 2	Schnitt 3	Schnitt 4
Milz K1	0	-	-	-	-
Milz K2	0	-	-	-	-
Milz 33	0	-	-	-	-
Milz 34	0	-	-	-	-
Milz 35	0	-	-	-	-
Milz 36	0	-	-	-	-
Milz 29	0,2	-	-	-	-
Milz 27	0,8	-	-	-	-
Milz 7	1,2	-	-	-	-
Milz 25	2,6	-	-	-	-
Milz 6	3,4	-	-	-	-
Milz 17	4,9	-	-	-	-
Milz 26	5,8	-	-	-	-
Milz 1	6,5	-	-	-	-
Milz 4	8,4	-	-	-	-
Milz 20	10	-	-	-	-
Milz 21	12	-	-	-	-
Milz 24	27	-	-	-	-
Milz d22c	100	-	-	-	-
Milz 10	127	-	-	-	-
Milz 9	138	-	-	-	-
Milz 11	187	-	-	-	-
Milz d22D	600	+	+	-	+
Milz d22E	662	-	-	+	+
Milz 12	716	-	-	-	-
Milz d22F	1100	+	+	+	-
Milz d29A	6500	+++	+++	+++	++

Lunge d29A	10000	++	+	++	+
Milz d29B	10312	++	+++	+++	+++
Milz d22C	>10000	+++	+++	+++	+++

Die Plus- und Minuszeichen stehen für folgende Ergebnisse bei der mikroskopischen Auswertung: waren Pilzstrukturen in jedem 6.-10. Gesichtsfeld bzw. fand sich mindestens ein Pilz pro Schnitt, ergab dies ein Pluszeichen, bei Pilzstrukturen in jedem 2.-6. Gesichtsfeld ergab dies zwei Pluszeichen, fanden sich in jedem Gesichtsfeld Pilzstrukturen, ergab dies drei Pluszeichen, während ein Minuszeichen signalisiert, dass keine Pilzzelle im gesamten Schnitt gefunden werden konnte.

Bei positiven Ergebnissen aller vier Schnitte wurde die Zeile dunkelgrau unterlegt. Bei positiven Ergebnissen von drei Schnitten wurde die Zeile mittelgrau unterlegt. Bei positiven Ergebnissen von zwei Schnitten wurde die Zeile hellgrau unterlegt. Bei negativen Ergebnissen aller vier Schnitte oder nur einem positiven Schnitt wurde die Zeile nicht farbig unterlegt. KBE/mg bedeutet Kolonie bildende Einheiten pro mg Organ in der Pilzkultur.

In Abbildung 1 (Seite 48) sind exemplarisch alle vier Färbemethoden in folgender Reihenfolge dargestellt: HE-Färbung (Bild A), Grocott-Färbung (Bild B), Fluoreszenzfärbung (Bild C) und Immunhistologie (Bild D).

3.2 Vergleich der Methoden

Für jede Methode wurde ein Modell nach der größten Wahrscheinlichkeit in Korrelation zu den KBE berechnet, die durch quantitative Kultur ermittelt worden waren.

Die 50% Quantilen und die 95% Konfidenz-Intervalle jeder Methode sind in Abbildung 3 (Seite 52) dargestellt. Es gab keine signifikante Differenz zwischen der Sensitivität der PCR und der Grocott-Färbung bei der Detektion von Pilzen ($p = 0,07$), wohingegen die PCR signifikant sensitiver war als die Fluoreszenzfärbung ($p = 0,005$), die Immunhistologie ($p < 0,0001$) und die HE-Färbung ($p < 0,0001$).

Die Grocott-Färbung war zwar signifikant sensitiver als die Immunhistologie ($p < 0,0001$) und die HE-Färbung ($p < 0,0001$), aber nicht sensitiver als die Fluoreszenzfärbung ($p = 0,17$).

Die Fluoreszenzfärbung war signifikant sensitiver als die HE-Färbung ($p < 0,0001$) und die Immunhistologie ($p = 0,0036$), die wiederum nicht sehr viel sensitiver war als die Routinefärbung HE.

In Abbildung 2 (Seite 50) wird die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses jeder Methode in Relation zu der Pilzlast, ausgedrückt als KBE/mg, gezeigt.

Um zu beweisen, dass das berechnete Modell geeignet ist, wurden die Milzproben in drei Gruppen zu 10 Einheiten gemäß den KBE unterteilt. Dann wurde die Anzahl an positiven Ergebnissen jeder Methode innerhalb jeder Gruppe verglichen mit der erwarteten Anzahl an positiven Ergebnissen anhand des Modells. Die Ergebnisse, die man in Abbildung 2 (Seite 50) sieht, erfordern keine weiteren statistischen Berechnungen mehr, weil sie deutlich zeigen, wie gut das Ergebnis mit dem Modell übereinstimmt.

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Diagnostik der Histoplasmose in Gewebeschnitten zu optimieren. Dazu wurde die Sensitivität von vier Färbemethoden, die routinemäßig eingesetzt werden, und einer neu etablierten PCR bestimmt. Die Verwendung von Gewebeproben eines Tiermodells ermöglichte die Quantifizierung der Kolonien bildenden Einheiten von *H. capsulatum* bezogen auf das Organgewicht, und damit den Vergleich der ermittelten Sensitivitäten. Zusätzlich wurden orientierend Zeitaufwand und Handhabung der Methoden beurteilt.

Die Nested-PCR war in dieser Studie die sensitivste der fünf Methoden zum Nachweis von *H. capsulatum* in Gewebeproben. Sie war signifikant sensitiver als drei der Färbemethoden, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied zur Grocott-Färbung. Diese zeigte keine signifikant bessere Sensitivität im Vergleich zur Fluoreszenzfärbung mit dem Stilbenfarbstoff, war jedoch der Immunhistologie und der HE-Färbung deutlich überlegen im Nachweis von Hefezellen des dimorphen Pilzes. Im Vergleich zu den drei erstgenannten Färbemethoden lag die Nachweisgrenze der Immunhistologie und der HE-Färbung um mindestens eine Logarithmus-Stufe niedriger. Während PCR, Grocott- und Fluoreszenzfärbung in Gewebeproben mit einer Erregerkonzentration von 1 bis 10 KBE/mg Organ in 50% zu einem positiven Ergebnis führen, benötigten Immunhistologie und HE-Färbung wenigstens 100 bis 600 KBE/mg Organ, um in der Hälfte der Fälle die Diagnose korrekt zu stellen.

Neben der großen Sensitivität bietet die PCR als einzige Methode die Möglichkeit einer Speziesidentifizierung. Nachteile der PCR sind relativ hohe Materialkosten, wenn eine Sequenzierung durchgeführt wird, der große Zeitaufwand von 4 bis 5 Stunden für die DNA-Extraktion, Ansatz der PCR, Darstellung im Gel, Aufreinigung des Amplifikates, erneute Amplifikation und Auftragung auf ein Gel für die halbautomatische Sequenzierung sowie die erforderliche Ausstattung des Labors mit den notwendigen Gerätschaften.

Da Grocott- und Fluoreszenzfärbung ebenfalls eine große Sensitivität aufweisen, erscheint bei menschlichen Gewebeproben eine der beiden Färbemethoden als Routinediagnostik ausreichend. Bei guter Färbetechnik und ausreichender Erfahrung des Untersuchers sollte der Nachweis respektive Ausschluss möglich sein, zumal bei einer Infektion des Menschen höhere Erregerkonzentrationen im Gewebe zu erwarten sind. Typischerweise werden bei der Histoplasmose des Menschen Granulome im Gewebe sichtbar, die bei der Diagnosestellung hilfreich sein können, aber im Mausmodell nicht beobachtet wurden.

Bei der Wahl zwischen Fluoreszenz- und Grocott-Färbung ist die Fluoreszenzfärbung zu bevorzugen, da der Zeitaufwand – die Grocott-Färbung benötigt 3,5 Stunden mehr als die Fluoreszenzfärbung – und die Kosten geringer sind. Weitere Vorteile der Fluoreszenzfärbung sind, dass sie weniger Erfahrung in der Durchführung und Beurteilung erfordert, und dass eine Nachfärbung z.B. von mit HE-Färbung gefärbten Schnitten möglich ist. Ein Nachteil der Fluoreszenzfärbung besteht in der unspezifischen Färbung anderer Strukturen, wodurch die Auswertung von Schnitten mit geringer Hefezellkonzentration erschwert wird, da die morphologische Zuordnung einzelner fluoreszierender, bis zu 5 µm großer, rundlicher Strukturen unmöglich wird. Dies kann aber auch bei der Grocott-Färbung Probleme bereiten. Zwar sind die Hefezellen bei guter Färbetechnik einfach zu identifizieren, im Einzelfall sind sie aber z.B. von gefärbten kleinen und verformten Erythrozyten nicht sicher differenzierbar.

Um der Vorgehensweise in der Routinediagnostik möglichst nahe zu kommen, wurde in dieser Studie jede Probe in Formalin eingelegt und in Paraffin eingebettet. Auf dieses Vorgehen wurde auch für die PCR nicht verzichtet, da eine PCR-Untersuchung häufig erst dann gewünscht wird, wenn die Probe schon histopathologisch aufgearbeitet ist. Trotz der bekannten Verminderung der DNA-Ausbeute durch die Fixation mit Formalin (1, 2, 12, 15, 30) war die PCR in dieser Arbeit die sensitivste Methode. Um den Sensitivitätsverlust durch Formalinfixierung zu vermeiden, sollte bei Verdacht auf eine Histoplasmose, ein Teil des gewonnenen Biopsates nativ oder – bei langen Transportzeiten – eingefroren in steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung für die DNA-Extraktion verwendet werden.

Die Zielsequenz der Nested-PCR liegt in einer konservierten Region des Gens, das für die 18S Untereinheit der ribosomalen RNA kodiert. Die etwa 1800 Basen lange Sequenz der ribosomalen DNA von *H. capsulatum* unterscheidet sich von der Gensequenz von *Blastomyces dermatitis* und *Paracoccidioidis brasiliensis* in nur etwa 15 Positionen (<1%) (3); Unterschiede in zwei Nukleotidpositionen des 231 bp langen Nested-PCR-Amplifikates ermöglichen aber die Abgrenzung von *H. capsulatum* gegenüber den beiden verwandten, humanpathogenen Pilzen.

Im Vergleich zu einer kürzlich publizierten In-situ-Hybridisierung zur Identifikation von Hefezellen durch einen für die 18S- und 28S-ribosomale DNA spezifischen Oligonukleotidcocktail (20), erscheint die in dieser Arbeit eingesetzte Methode sensitiver. Die Autoren konnten in nur 50% der lichtmikroskopisch als Histoplasmose diagnostizierten Gewebeschnitten eine Hybridisierung nachweisen, während in der vorliegenden Studie die PCR-Diagnostik der Lichtmikroskopie deutlich überlegen war. Für die unterschiedliche Sensitivität könnte die unterschiedliche Menge von Gewebeschnitten, nämlich einer für die Hybridisierung (20) und zwei für die DNA-Extraktion, verantwortlich sein.

Mit Hilfe des hier verwendeten kommerziellen Extraktionskits wurden DNA-Fragmente von bis zu 600 Basenpaaren bereits erfolgreich extrahiert (38). Für die Extraktion von fungaler DNA ist es jedoch erforderlich, die Zellwand der Hefezellen zu zerstören, um die DNA freizusetzen. Wie bereits bei Hefezellen des verwandten, dimorphen Pilzes *Paracoccidoides brasiliensis* erfolgreich angewendet, wurden in dieser Studie die Proben ebenfalls dreimal im Wechsel in Flüssigstickstoff eingefroren und anschließend gekocht (3). Zusätzlich wurde bei der Extraktion eine hohe Konzentration von Proteinase K verwendet, da der Proteinverdau die Ausbeute von qualitativ hochwertiger DNA fördert (12).

Im Gegensatz zu den Färbemethoden mit vier Gewebeschnitten pro Testreihe wurden bei der PCR nur zwei Ansätze pro Organ durchgeführt. Um die Ergebnisse der PCR und der Färbemethoden aber trotzdem vergleichen zu können, wurde bei der statistischen

Auswertung festgelegt, dass jeweils die Hälfte der PCR-Ansätze bzw. Gewebeschnitte positiv sein musste, um den Befund des infizierten Organs als positiv zu werten.

Die Grocott-Färbung ist eine gute Färbemethode, um Pilze in Gewebe darzustellen, weil sie starke Kontraste bildet und auch in alten Gewebeproben und durch andere Färbemethoden nicht darstellbare Pilze sichtbar macht (6). Sie gehört zu den Färbungen, die standardmäßig in vielen Laboren verwendet wird. Vorteile der Färbung sind, dass sie insbesondere für kleine Organismen wie *Histoplasma capsulatum*, das einen Durchmesser von 2-4 µm aufweist, geeignet ist (24). Auch einzelne Pilzzellen können identifiziert werden (34). Die Inhaltsstoffe, die man für die Grocott-Färbung benötigt, sind stabil (18).

Ein Nachteil der Grocott-Färbung ist die Möglichkeit der Ausfällung des Silbers, so dass runde unspezifische Formen entstehen, die mit Hefezellen leicht verwechselbar sind (29). Bei einer zu langen Inkubationszeit mit Silbernitrat kann es außerdem zu einer Anfärbung von Blutzellen wie Erythrozyten oder Leukozyten kommen, die die Form der Pilzzellen nachahmen können (33).

Eine weniger zeitaufwendige Grocott-Färbemethode von nur 10 Minuten wurde beschrieben, die nicht nur schneller, sondern auch sicherer in der Diagnosenstellung sein soll (29, 34). Dies wird jedoch kontrovers diskutiert, nach Meinung von Monheit et al. ist die Methode relativ grob und prädestiniert für technische Fehler (27).

In der vorliegenden Studie wurde die ursprüngliche Form der Grocott-Färbung durchgeführt. Sie zeigte im Vergleich zu anderen Färbemethoden eine hohe Sensitivität. Die bräunlich-schwarzen Hefezellen zeichneten sich deutlich gegen den grünlichen Hintergrund ab. Bei einzelnen Färbungen wurden Ausfällungen von Silber beobachtet, was die Auswertung erschwerte, aber niemals unmöglich machte. Bei der Fluoreszenzfärbung handelt es sich um eine einfach durchführbare Färbemethode, die bei Gegenfärbung mit Evans-blue innerhalb von 30 Minuten durchführbar ist (4, 7, 27). Letztere wird zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz empfohlen (31).

Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. *Calcofluor weiß* färben sehr viele Pilzarten, aber auch Gewebsbestandteile wie Kollagen, Keratin und Elastin, und teilweise auch Bakterien (27, 28). Bei Pilzen binden sie an die Zellelemente Chitin und Glucan (4, 31, 32), so dass die Pilzwände blau bis grünlich-blau fluoreszieren. Sie sind scharf abgegrenzt und heben sich gut vom schwarzen Hintergrund ab. Inzwischen haben sie sich als nützlich für die Detektion von Pilzelementen in allen Arten von Gewebe erwiesen (32).

Vorteile der Fluoreszenz-Färbung sind der geringe Arbeitsaufwand und die schnelle Erlernbarkeit der Methode. Nachteile der Methode sind die fehlende Spezifität und das Versagen bei der Anfärbung degenerierter Pilze (27). Zudem ist ein Fluoreszenz-Mikroskop mit Ultraviolett-/Violett-Anregung Voraussetzung für die Beurteilung der gefärbten Gewebeschnitte.

Das in dieser Studie verwendete Stilben-Derivat Fungiqua A bindet an Polymere der Pilzwand, die nicht in menschlichen Zellen vorhanden sind (8). Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie einfach anzuwenden ist und der Farbstoff auf routinemäßig mit HE-vorgefärbte Schnitte nachträglich aufgetragen werden kann. Zusammen mit der Grocott-Färbung zeigte sie eine hohe Sensitivität und grenzte sich in Bezug auf die Sensitivität auch deutlich gegenüber der HE-Färbung und der Immunhistologie ab.

Einige Pilze wie z.B. *Blastomyces dermatitidis* oder *Candida albicans* weisen eine Autofluoreszenz in mit HE-gefärbten Gewebsschnitten auf, die für die Identifikation genutzt werden kann (26). Hefezellen von *H. capsulatum* variieren jedoch erheblich bezüglich ihrer Autofluoreszenz (26). Die Ursache dafür ist unbekannt. In den mit HE-gefärbten Schnitten der vorliegenden Arbeit konnte keine Autofluoreszenz der Pilzzellen nachgewiesen werden.

Die für die Immunhistologie verwendeten, von Kaninchen stammenden Antikörper gegen *Mycobacterium bovis* sind kommerziell erhältliche polyklonale Antikörper. Wiley et al. beschrieben Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern, die gegen Mykobakterien gerichtet sind, mit Pilzzellen (39). Kutzner et al. verwendeten polyklonale Antikörper gegen *Mycobacterium bovis* zum Nachweis von

Mikroorganismen (22). Sie konnten sowohl gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli*, als auch Hefezellen von *Blastomyces dermatitis* und *Candida albicans* mittels Anti-*Mycobacterium-bovis*-Antikörpern immunhistologisch nachweisen.

Als Vorteile dieser Färbung stellten sie eine geringe Hintergrundfärbung und die hohe Sensitivität dieser Methode dar, die sie gegen die üblichen histochemischen Färbemethoden abhebt. Bestätigen ließ sich in dieser Studie, dass sich die Pilze rötlich anfärben und sich gut gegenüber dem Hintergrund abheben. Eine Speziesidentifikation war jedoch anhand der Färbung nicht möglich, zumal die typische Zellform von *Histoplasma capsulatum* häufig nicht mehr erkennbar war. Zudem waren die angefärbten Strukturen unscharf begrenzt.

Im Vergleich mit Grocott- und Fluoreszenz-Färbung war die Methode weniger sensitiv. Hervorzuheben bleibt, dass diese zeit- und materialaufwendige Färbung keinen Informationsgewinn im Vergleich mit der routinemäßig durchgeführten HE-Färbung brachte. Damit die Antikörper gebunden werden und diese Bindung sichtbar gemacht werden kann, werden Gewebeschnitte von nur 2 µm Dicke verwendet, während für alle anderen Färbungen 4 µm dicke Schnitte benützt werden. Diese Volumenreduktion könnte für die deutlich geringere Sensitivität verantwortlich sein.

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine vielseitige Färbemethode, die unter anderem zur Beurteilung der Zellen eines Gewebes verwendet wird. Sie gilt als Routinefärbung und wird häufig als Grundfärbung vor einer pilzspezifischen Färbemethode durchgeführt (16).

Die HE-Färbung war die am wenigsten sensitive Methode. Im Vergleich zu den anderen Färbungen sind wenigstens 10- bis 100-fach höhere Erregerkonzentrationen erforderlich, um eine sichere Diagnose in jedem Gewebeschnitt des betroffenen Organs zu stellen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die verwendeten Milzproben der Mäuse keine für die Histoplasmose des Menschen typischen Granulome aufwiesen. Diese können in der HE-Färbung Hinweise auf eine Pilzinfektion geben und Anlass für

weitere Färbungen sein (16), so dass die Sensitivität der HE-Färbung bei menschlichen Untersuchungsmaterial möglicherweise höher ist als in diesem Mausmodell.

Schlussfolgerung

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann bei Verdacht auf Histoplasmose die zusätzliche Färbung mit Funquiqual A empfohlen werden, wenn ein entsprechendes Mikroskop für die Auswertung vorhanden ist. Andernfalls sollte in Ergänzung der routinemäßig durchgeführten Hämatoxylin- und Eosin-Färbung die Grocott-Färbung durchgeführt werden, um keine Infektionen mit *Histoplasma capsulatum* zu übersehen. Die zeitaufwendige Nested-PCR bringt im Vergleich dazu keine signifikante Verbesserung der Sensitivität. Da sie jedoch die einzige Methode ist, die eine Erregeridentifizierung gestattet, sollte sie in Einzelfällen zur Sicherung der Diagnose erwogen werden. Von der zeit- und materialaufwendigen Immunhistologie unter Verwendung von Anti-*Mycobacterium-bovis*-Antikörpern kann keine Verbesserung der Sensitivität in der Diagnostik der Histoplasmose erwartet werden.

5 Zusammenfassung

Um die Diagnose einer Infektion mit *Histoplasma capsulatum* zu optimieren, wurden 30 Milzen von mit *H. capsulatum* infizierten Mäusen mit der HE-, der Grocott-, einer BCG-Antikörper- und einer Fluoreszenzfärbung mit Fungiqua A sowie einer Nested-PCR untersucht.

Die Ergebnisse wurden mit den Erregerkonzentrationen pro Organ verglichen, die mit Hilfe einer quantitativen Kultivierung ermittelt worden waren. Mit Hilfe der logistischen Regression wurde die Nested-PCR als die sensitivste Methode ermittelt, allerdings stellte sich heraus, dass sie nicht signifikant sensitiver ist als die Grocott-Färbung.

Die Fluoreszenzfärbung und die Grocott-Färbung waren ebenfalls nicht signifikant verschieden in Bezug auf die Sensitivität. Beide Färbungen waren signifikant sensitiver als die HE-Färbung und die Immunhistologie, die sich in Bezug auf Sensitivität nicht signifikant voneinander unterschieden. Die Nested-PCR war die einzige Methode die eine spezies-spezifische Diagnose ermöglichte.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann bei Verdacht auf Histoplasmose die Fluoreszenzfärbung mit Fungiqua A in Ergänzung zur routinemäßig durchgeführten HE-Färbung empfohlen werden, wenn ein entsprechendes Mikroskop für die Auswertung vorhanden ist. Ist dies nicht der Fall, sollte die Grocott-Färbung durchgeführt werden, um keine Infektionen mit *Histoplasma capsulatum* zu übersehen. Die zeitaufwendige Nested-PCR bringt im Vergleich dazu zwar keine signifikante Verbesserung der Sensitivität, weist jedoch den Vorteil einer möglichen spezies-spezifischen Identifizierung des Pathogens auf. Aus diesem Grund sollte sie in Einzelfällen zur Sicherung der Diagnose erwogen werden. Von der zeit- und materialaufwendigen Immunhistologie unter Verwendung von Anti-BCG-Antikörpern kann keine Verbesserung der Sensitivität in der Diagnostik der Histoplasmose erwartet werden.

6 Anhang

6.1 Häufig verwendete Abkürzungen

Aqua bidest	Zweimal destilliertes Wasser
Aqua tridest	Dreimal destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BSA	Bovines Serumalbumin
BPB	Bromphenolblau
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylenediaminetet-acetate acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
et al.	Und andere
EtBr	Ethidiumbromid
Fc	fragment crystalline
fg	Femtogramm
H.	Histoplasma
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
HIV	Human immunodeficiency virus
ICR	Institute for Cancer Research
i.v.	intravenös
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
M	Mol

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
Nr.	Nummer
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Perkin Elmer
pmol	Picomol
pg	Picogramm
rpm	Round per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecalsulfat)
TAE	Tris-Acetat-Edta Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered saline (Tris-Puffer)
Tris	Tris-hydroxethyl-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
Vol	Volumenteile, Volumen

6.2 Abbildung 1

Bild A (HE-Färbung)

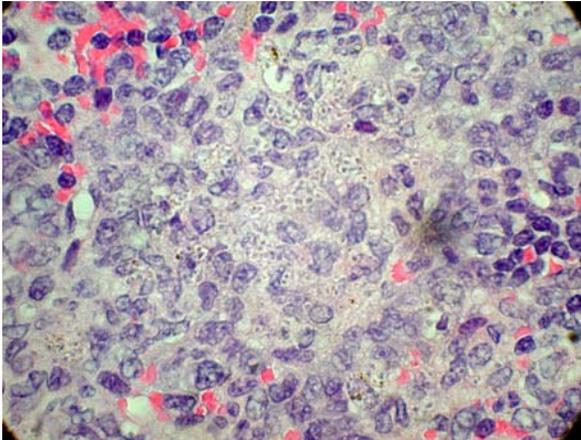


Bild B (Grocott-Färbung)

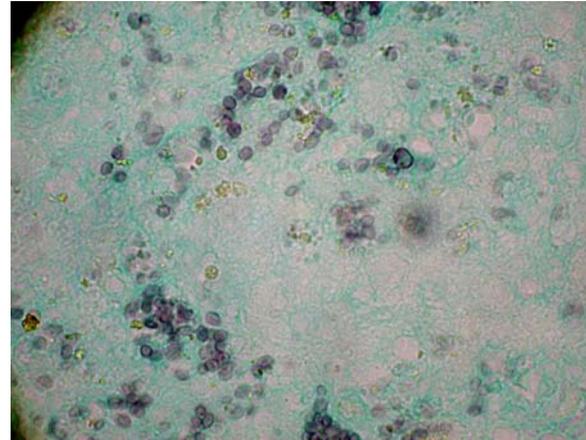


Bild C (Fluoreszenz-Färbung)

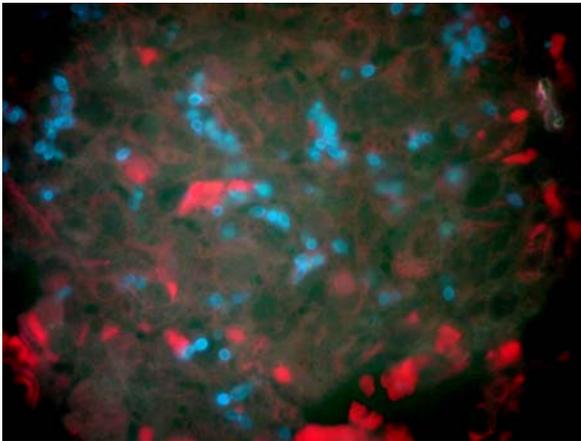
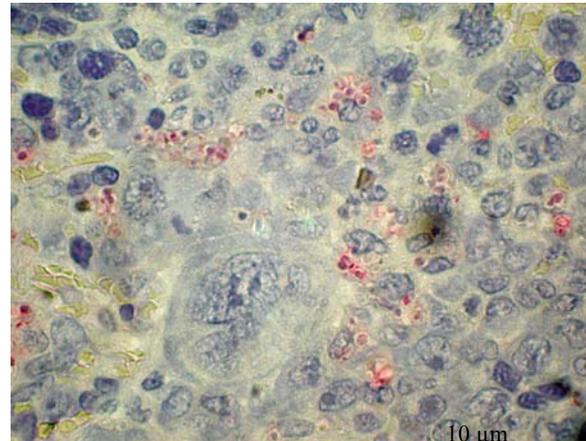


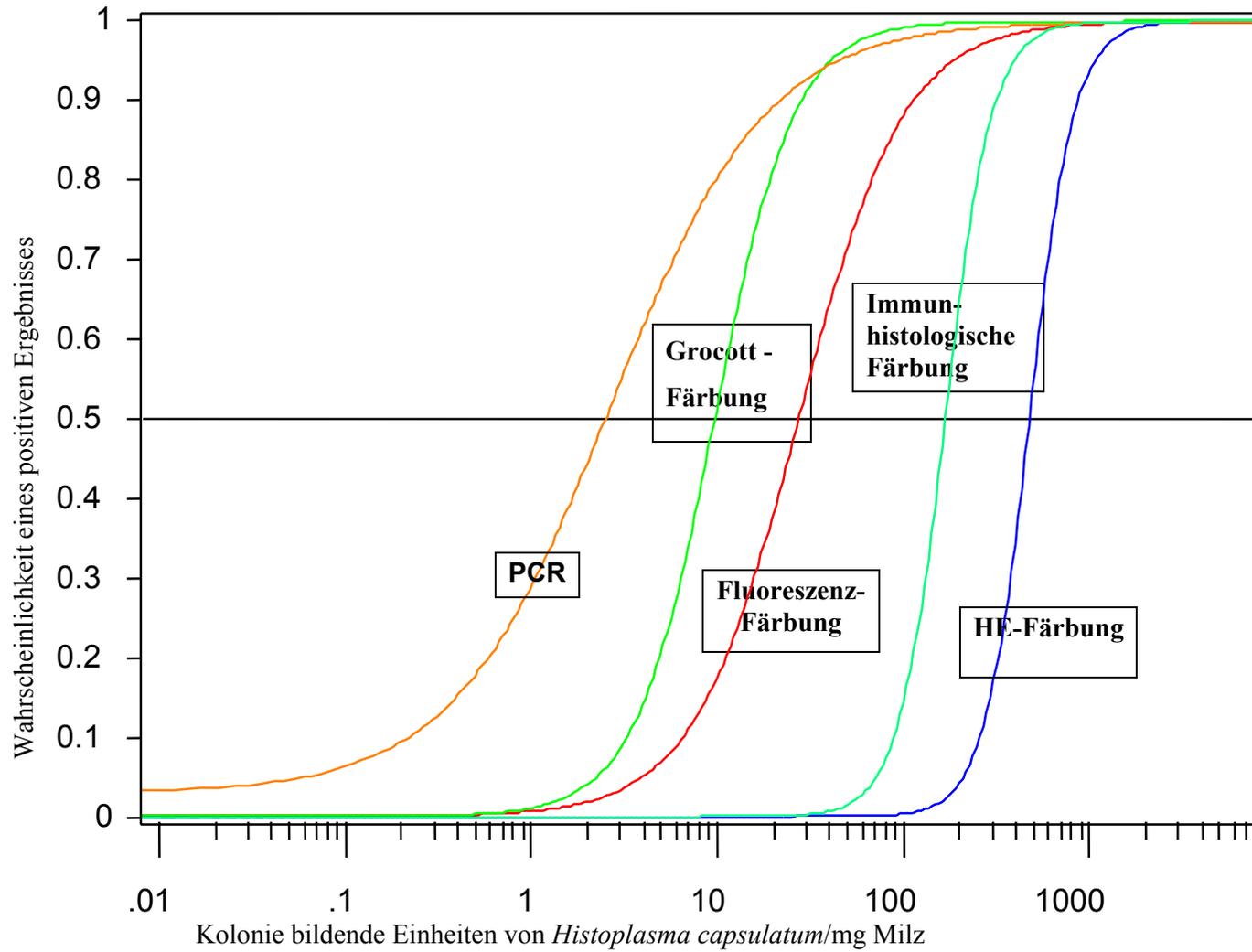
Bild D (Immunhistologie)



Legende zu Abbildung 1

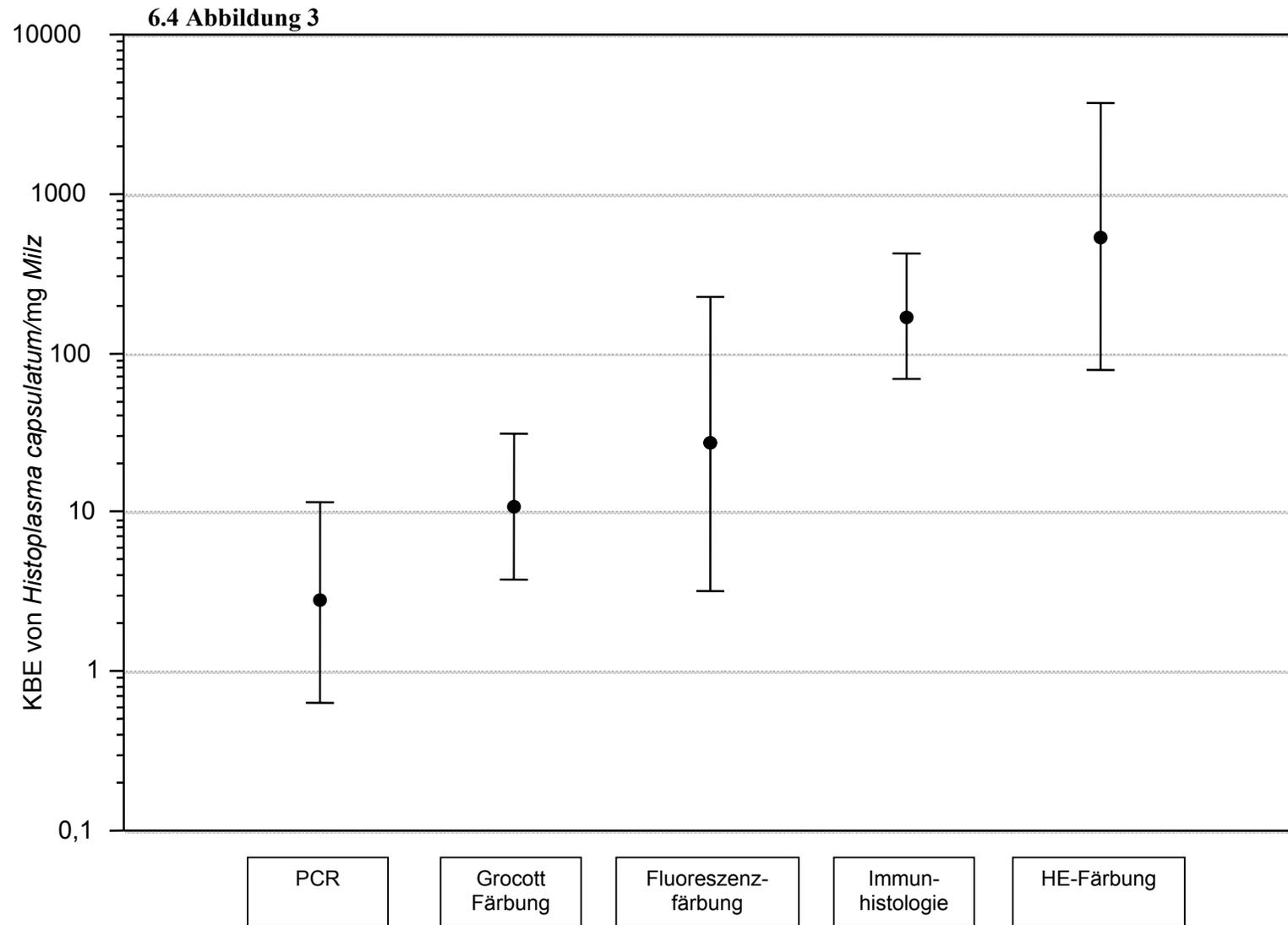
Abbildung 1 zeigt *Histoplasma capsulatum* in Gewebsschnitten aus Mäusemilzen (6500 KBE/mg Organ), gefärbt mit HE-Färbung (Bild A), Grocott-Färbung (Bild B), Fluoreszenzfärbung mit Fungiquil A (Bild C, fotografiert unter einem Auflichtfluoreszenzmikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 390-420 nm und einem Fluoreszenzfilter bei 450 nm) und Immunhistologie unter Verwendung von Anti-*Mycobacterium bovis*-Antikörpern (Bild D). Originalgröße x 1000

6.3 Abbildung 2



Legende zu Abbildung 2

In Abbildung 2 sind die logistischen Regressionsmodelle für die 5 untersuchten Methoden zur Detektion von *Histoplasma capsulatum* in Mäuseschnitten abgebildet. Die Abbildung zeigt die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses jeder Methode für eine bestimmte Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten von *Histoplasma capsulatum* pro Milligramm Organgewebe.



Legende zu Abbildung 3

Abbildung 3 zeigt die 50% Quantilen und deren 95% Konfidenzintervalle jeder Methode, die zur Detektion von *Histoplasma capsulatum* in Mäusegewebsschnitten untersucht wurde in Relation zu der Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten pro Organ.

7 Literatur

1. Ben-Ezra, J., Johnson D.A., Rossi, J., Cook, N., Wu, A. (1991)
Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin embedded material by the polymerase chain reaction
J. Histochem. Cytochem. 39, 351-354

2. Bialek, R., Fischer, J., Feucht, A., Najvar, L.K., Dietz, K., Knobloch, J., Graybill, J.R. (2001)
Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay
J. Clin. Microbiol. 39, 1505-1509

3. Bialek, R., Ibricevic, A., Fothergill, A.W., Begerow, D. (2000)
Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*
J. Clin. Microbiol. 38, 3190-3193

4. Borg-von Zeppelin, M., Wagner, T. (1995)
Fluorescence assay for the detection of adherent *Candida* yeasts to target cells in microtest plates
Mycoses 38, 339-347

5. Bradsher, R.W. (1996)
Histoplasmosis and Blastomycoses
Clin. Infect. Dis. 22 (Suppl. 2), S102-111

6. Bullock, W.E. (1995)
Histoplasma capsulatum, 2340-2351
in: Mandell, G.L., Dolin, R., Bennett, J.E.: *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*
4. Aufl., Churchill Livingstone Inc. 1995, New York

7. Chander, J., Chakrabarti, A., Sharma, A., Saini, J.S., Panigarhi, D. (1993)
Evaluation of Calcofluor staining in the diagnosis of fungal corneal ulcer
Mycoses 36, 243-245

8. Coleman T., Madassery J.V., Kobayashi G.S., Nahm, M.H., Little, J.R. (1989)
New fluorescence assay for the quantification of fungi
J. Clin. Microbiol. 27, 2003-2007

9. Collins, M.H., Jiang, B., Croffie, J.M., Chong, S.K.F., Lee, C.H. (1996)
Hepatic Granulomas in Children
Am. J. Surg. Pathol. 20(3):332-338

10. Darling, S.T. (1906)
A Protozoen general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen and lymphnodes
JAMA 46:1283-1285
11. Denk, H. (1989)
Immunhistochemische Färbemethoden, 251-263
in: Romeis, B., Böck, P.: Mikroskopische Technik
17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
12. Diaz-Cano S.J., Brady, S.P. (1997)
DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high quality DNA
Diagn. Mol. Pathol. 6, 342-346
13. Eissenberg, L.G., Goldman, W.E. (1991)
Histoplasma variation and adaptive strategies for parasitism: New perspectives on Histoplasmosis
Clin. Microbiol. Rev. 4, 411-421
14. Fisher, F., Cook, N.B. (1998)
Histoplasma capsulatum, 247-251
in: Fisher, F., Cook, N.B., Fundamentals of Diagnostic Mycology
1. Aufl., W.B. Saunders Company, Philadelphia
15. Frank, T.S., Svoboda-Newman S.M., Hsi E.D. (1996)
Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR
Diagn. Mol. Pathol. 5, 220-224
16. Goodwin, R.A., Shapiro, J.L., Thurman, G.H., Thurman, S.S., Des Prez, R.M. (1980)
Disseminated Histoplasmosis: Clinical and Pathologic Correlations
Medicine 59, 1-33
17. Graybill, J.R. (1988)
Histoplasmosis and AIDS
J. Infect. Dis. 158, 623-626
18. Grocott, R.G. (1955)
A stain for fungi in tissue sections and smears.
Am. J. Clin. Pathol. 25, 975-979
19. Hamilton, A.J. (1998)
Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends
Medical mycology 36, 351-364

20. Hayden, R.T., Qian, X., Roberts, G.D., Lloyd, R.V. (2001)
In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue sections
Diagn. Mol. Pathol. 10, 15-23
21. Huang, C.T., McGarry, T., Cooper, S., Saunders, R., Andavolu, R. (1987)
Disseminated Histoplasmosis in the Acquired Immunodeficiency Syndrome
Arch. Intern. Med. 147, 1181-1184
22. Kutzner, H., Argenyi, Z.B., Requena, L., Ruetten, A., Huegel, H. (1998)
A new application of BCG antibody for rapid screening of various tissue microorganisms
J. Am. Acad. Dermatol. 38, 56-60
23. Lamps, L.W., Molina, C.P., West, A.B., Haggitt, R.C., Scott, M.A. (2000)
The pathologic spectrum of gastrointestinal and hepatic Histoplasmosis
Am. J. Clin. Pathol. 113, 64-72
24. Lopez, J.F., Grocott, B.S. (1968)
Demonstration of *Histoplasma capsulatum* in peripheral blood by the use of methenamine-silver nitrate stain (Grocott's)
Am. J. Clin. Pathol. 50, 692-694
25. Luna, L.G., (1968)
Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institutes of Pathology,
230-232
3. Aufl., Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC
26. Mann J.L. (1983)
Autofluorescence of fungi: an aid to detection in tissue sections
Am. J. Clin. Pathol. 79, 587-590
27. Monheit, J.E., Cowan, D.F, Moore, D.G. (1984)
Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy
Arch. Pathol. Lab. Med. 108, 616-618
28. Monheit, J.G., Brown, G., Kott, M.M., Schmidt, W.A., Moore, D.G. (1985)
Calcofluor white detection of fungi in cytopathology
Am. J. Clin. Pathol., 85, 222-225
29. Musto, L., Flanigan, M., Elbadawi, A. (1982)
Ten-Minute silver stain for *Pneumocystis carinii* and fungi in tissue sections
Arch. Pathol. Lab. Med. 106, 292-294
30. Ohara, Y., Honma, M., Iwasaki, Y. (1992)
Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting human T-cell leukemia virus type I sequences in paraffin-embedded tissue. Effect of unbuffered formalin fixation
J. Virol. Methods 37, 83-88

31. Ruechel, R., Margraf, S. (1993)
Rapid microscopical diagnosis of deep-seated mycoses following maceration of fresh specimens and staining with optical brighteners
Mycoses 36, 239-242
32. Ruechel, R., Schaffrinski, M. (1999)
Versatile fluorescent staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor
J. Clin. Microbiol. 37, 2694-2696
33. Salfelder, K., Schwarz, J., Sauerteig, E. (1980)
Histoplasmosis, 45-56
in: Atlas of deep mycoses by Karlhanns Salfelder M.D.
1. Aufl., W.B Saunders company, Philadelphia
34. Shimono, L.H., Hartman, B. (1986).
A simple and reliable rapid Methenamine Silver Stain for *Pneumocystis carinii* and Fungi
Arch. Pathol. Lab. Med. 110; 855-856
35. Stobierski, M.G., Hospedales, C. J., Hall, W.N., Robinson-Dunn, B., Hoch, D., Sheill, D.A. (1996)
Outbreak of Histoplasmosis among Employees in a Paper Factory-Michigan, 1993.
J. Clin. Microbiol. 34, 1220-1223
36. Walsh, T.J., Catchatourian, R., Cohen, H. (1983)
Disseminated Histoplasmosis complicating bone marrow transplantation
Am. J. Clin. Pathol. 79, 509-5114
37. Wheat, J., Sarosi, G., McKinsey, D., Hamill, R., Bradsher, R., Johnson, P., Loyd, J., Kauffman, C. (2000)
Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis
Clin. Infect. Diseases 30, 688-695
38. Wickham, C.L., Boyce, M., Joyner, M.V., Sarsfield, P., Wilkins, B.S., Jones, D.B., Ellard, S. (2000)
Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsies
Mol. Pathol. 53, 19-23
39. Wiley, E.L., Beck, B., Freeman, R.G. (1991)
Reactivity of fungal organisms in tissue sections using anti-mycobacteria antibodies
Cutan. Pathol. 18, 204-209

8 Danksagung

Ich danke

Herrn Dr. Bialek, Herrn Prof. Dr. Knobloch und Frau Prof. Dr. Lever für die umfassende, exzellente und engagierte Betreuung sowie die Ermöglichung der Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen des Histologischen Labors der Universitätsklinik für Dermatologie in Tübingen sowie den Mitarbeitern des Labors des Tropeninstitutes in Tübingen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung und ihre gute Betreuung. Herrn Prof. Dr. Dietz danke ich für die Bearbeitung der statistischen Daten.

Andreas danke ich für seine unermüdliche Geduld und seine Hilfe, meiner Familie und meinen Freunden für die Motivation und Unterstützung.

9 Lebenslauf

Name: Lerchner-Ernst
Vornamen: Friederike Ingeborg Charlotte
Geburtsdatum: 28.1.1976
Geburtsort: Heidelberg
Nationalität: Deutsche
Eltern: Dr. Lieselotte und Rainer Ernst
Zivilstand: verheiratet

Schulausbildung:

1982-1986 Grundschule in Heidelberg
1986-1995 Kurfürst Friedrich Gymnasium, Heidelberg
1995 Abitur

Studium:

1995 Beginn des Medizinstudiums an der Philipps Universität in Marburg
1997 Physikum, danach Wechsel an die Eberhard Karls Universität in Tübingen
1998 1. Staatsexamen
2001 2. Staatsexamen, danach Beginn des Praktischen Jahres:
1. Tertial: Chirurgie im Kreiskrankenhaus Sigmaringen, Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen
2. Tertial: Innere Medizin im Kantonsspital Sarnen, Obwalden
2001/2002: 3. Tertial: Psychiatrie, 2 Monate am Kreiskrankenhaus Sigmaringen, 2 Monate an der Universitätsklinik Basel
03.05.2003 3. Abschnitt der Aertzlichen Prüfung

Praktika:

1995 Teilnahme am „Dr. Bessy F. Lawrence International Summer Science Institute“ am Weizmann Institiut, Rehovot, Israel
1997 4-wöchiges Praktikum im Deutschen Krebsforschungsinstitut in Heidelberg
1998 5-wöchige Famulatur Allgemeinchirurgie, Heidelberg
 4-wöchige Famulatur Innere Medizin, Heidelberg
1999 8-wöchige Famulatur in Intensivmedizin, Kantonsspital Aarau
2000 8-wöchige Famulatur in Infectious Diseases in Edinburgh
 9-wöchiger Forschungsaufenthalt in San Antonio, Texas
1998-2000 Mitarbeit als studentische Vertreterin bei Habilitationsverfahren und einer Berufungskommission für die Medizinische Fakultät

AIP

1.7.2002 AIP in der Psychiatrischen Klinik Königsfelden, Schweiz