

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Vergleich der Nachweisverfahren von Candida – DNA
mittels PCR – ELISA,
einer gattungsspezifischen Candida – Sonde im
LightCycler™,
Gelelektrophorese,
Sequenzierung und der
Mikrobiologischen Untersuchung
bei intensivmedizinisch betreuten Patienten**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard – Karls – Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Hanna Baumann, geb. Baur
aus
Böblingen
2005**

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Einsele

2. Berichterstatter:

Frau Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Klinische Bedeutung von Pilzinfektionen	7
1.1.1 Epidemiologie	8
1.2 Risikofaktoren und Klinik systemischer Mykosen	8
1.3 Diagnostik systemischer Mykosen	10
1.3.1 Mikroskopie/ Histologie	10
1.3.2 Pilzkultur	11
1.3.3 Candida - Antigentest	11
1.3.4 Candida – Antikörpertest	12
1.3.5 Molekularbiologisch mittels PCR	12
1.3.6 Sequenzierung	12
1.3.7 Bildgebende Verfahren	13
1.4 Therapie systemischer Mykosen	13
1.5 Candida - Infektionen	16
1.6 Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	
2.1 Methoden	20
2.1.1 DNA - Extraktion	20
2.1.2 Konventionelle PCR und PCR - Elisa	21
2.1.3 Real – time PCR mit dem Lightcycler™	24

2.1.3.1	Die Lightcycler™ - Sonden und Primer	26
2.1.3.2	Dokumentation und Schmelzkurvenanalyse mit dem Lightcycler™	28
2.1.4	Gelektrophorese	28
2.1.5	Sequenzierung	29
2.1.6	Mikrobiologische Untersuchung	31
2.1.7	Verdünnungsreihen	31
2.1.8	Kontaminationsmonitoring	32
2.2	Materialien und Bezugsquellen	32
2.2.1	Geräte	32
2.2.2	Enzyme, Primer, Gensonden	33
2.2.3	Verbrauchsgegenstände	33
2.2.4	Chemikalien	33
2.3	Patientenproben	43
3.	Ergebnisse	
3.1	Exemplarische Darstellung der Untersuchungsmethoden	44
3.1.1	Gelelektrophorese	44
3.1.2	LightCycler™	45
3.1.3	Sequenzierung	46
3.1.4	Sensitivität des LightCycler unter Einsatz der Common Candida Sonde	48
3.1.5	Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse mit dem LightCycler	48
3.1.6	Ergebnisermittlung mittels PCR - ELISA	49
3.2	Verteilung der verschiedenen Candida spp auf die Proben	50

3.2.1	Proben aus dem oberen Respirationstrakt	50
3.2.2	Proben aus dem Bauchraum	54
3.2.3	Katheterurinproben	56
3.2.4	Vollblutproben	58
3.2.5	Beimpfte Vollblutproben	59
3.3	Verteilung der verschiedenen Candida spp auf die Proben	60
3.4	Arbeitsaufwand und Kosten im Vergleich	61
4.	Diskussion	63
5.	Zusammenfassung	74
6.	Literaturverzeichnis	78
Anhang		
	Abkürzungen	87
	Lebenslauf	91

1. Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung von Pilzinfektionen

Sowohl in der Hämatologie und der Onkologie als auch in der Intensivmedizin hat es in den letzten Jahren große Fortschritte gegeben. Die Intensivmedizin hat die antimikrobielle Therapie intensiviert, und bei der Tumorbekämpfung werden zunehmend aggressivere Therapieprotokolle umgesetzt.

Diese Therapien bringen eine immer länger dauernde Immunsuppression der Patienten mit sich, mit zunehmender Neutropenie oder kombinierten B- und T-Zelldefekten (11,55,61,4).

Als Hochrisikopatienten gelten zum Beispiel Patienten mit einer schweren Neutropenie (unter 800 / μ l über einen Zeitraum von über 10 Tagen) wie nach allogener Stammzelltransplantation oder unter Kortikoidtherapie.

Aufgrund dieser Abwehrschwäche kommt es zu Infektionen mit Erregern, die immunkompetente Patienten nicht treffen würden. In diesem Zusammenhang haben in den letzten zwanzig Jahren Pilzinfektionen stark an Bedeutung gewonnen.

Häufigste Erreger sind Pilze der Gattung *Candida* und *Aspergillus* (38). Die Letalität einer Candidämie liegt laut EORTC – Angaben bei 40 % (68). In 9.9% aller Septikämien ist *Candida albicans* der Erreger (5).

Aber auch Non-*albicans* – Infektionen haben in den letzten Jahren deutlich zugenommen. *Candida albicans* ist nur noch bei ca. 40 – 50% aller *Candida* – Infektionen zu isolieren, und *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* sowie *Candida lusitanae* gewinnen zunehmend an Bedeutung.

Um die Heilungschancen zu erhöhen ist es notwendig, möglichst früh die adäquate Therapie einzuleiten. Da das klinische Bild invasiver Mykosen jedoch fast nie eindeutig ist, muss die Diagnose mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Untersuchungen gestellt werden. Ziel muss es sein, möglichst schnell und in verschiedenen klinischen Materialien Pilze

nachweisen zu können. Momentan werden noch 70% aller Pilzinfektionen erst post mortem nachgewiesen (64).

1.1.1 Epidemiologie

In den letzten Jahren haben Pilzinfektionen bei immuninkompetenten Patienten immer mehr zugenommen (7,13,29), aber auch Viren treten als Infektionserreger bei diesem Patientenkollektiv stärker in Erscheinung (68). Außerdem treten inzwischen auch Pilzspezies in Erscheinung, die insgesamt selten sind oder früher als apathogen galten (24,26).

Zu den Erregern invasiver Mykosen zählen vor allem *Aspergillus flavus* und *Candida albicans*, wobei zunehmend auch non – *albicans* – spezieen auftreten (48). Bei nosokomialen Infektionen mit *Candida* entfallen 72% auf *C.albicans*, 7% auf *C.tropicalis*, 6% auf *C.glabrata*, 2% auf *C.parapsilosis* und 13% auf andere *Candida* spp (38). Bei Hochrisikopatienten wie zum Beispiel nach allogener Stammzelltransplantation beträgt die Inzidenz systemischer Mykosen ca 20%. Dabei werden 30% der Infektionen durch *Aspergillus* und 7% durch *Candida* hervorgerufen(19).

1.2 Risikofaktoren und Klinik systemischer Pilzinfektionen

Zu systemischen Pilzinfektionen kommt es bedingt durch den fakultativ pathogenen Charakter der Erreger nur bei immunsupprimierten Patienten, insbesondere bei ausgeprägter Neutropenie oder kombinierten B – und T – Zelldefekten. Die Pilze haben grundsätzlich ein relativ geringes pathogenes Potential.

Ursachen und Risikofaktoren der Immunsuppression sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 : Risikofaktoren Systemischer Mykosen

Therapiebedingte Immunsuppression	Onkologische, Hämatologische Erkrankungen, Transplantationen mit immunsuppressiver Therapie, insbesondere bei gleichzeitigem Auftreten von GvH – Reaktion und hochdosierter Cortikoid – Therapie (12)
Invasive Therapie	Polytraumata, abdominelle Chirurgie , langliegende ZVK
Sonstige	Frühgeburtlichkeit, Antibiotische Therapie Verbrennungsoffer Alkoholismus und Drogensucht Hohes Lebensalter, Hämodialyse
Grunderkrankungen	Lang bestehender D. m., Zystische Fibrose, AIDS, anamnestic Pilzkrankungen, Schleimhautbesiedelung

Der wichtigste Risikofaktor ist die schwere Neutropenie unter 800/ μ l über einen Zeitraum von mehr als 10 Tagen (58). Die Inzidenz systemischer Mykosen bei Hochrisikopatienten nach allogener Stammzelltransplantation liegt inzwischen bei 20 % (31). Die häufigsten Erreger sind hier Candida und Aspergillus. Die Mortalität ist hoch, an einer Candidose versterben circa 25 %, an einer Aspergillose 99 %.

Die Klinik einer invasiven Mykose ist sehr unspezifisch und insbesondere im Anfangsstadium nicht von anderen Infektionen zu unterscheiden. Es kommt zu Fieberschüben und einem Anstieg der unspezifischen Infektionsparameter wie CRP und Leukozyten. Antibiotikaresistentes persistierendes Fieber, Sehstörungen, makulopapulöse Hautläsionen, Myalgien, Leber – und Milzdruckschmerz können auf eine Candidose hinweisen. Auch bildgebende Verfahren wie CT und MRT sind zur Diagnose grundsätzlich geeignet, werden aber meist erst in einem späten Stadium aussagekräftig. Blutkulturen bleiben häufig negativ, und die Patienten können aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes oft keinen invasiven Untersuchungsmethoden wie zum Beispiel einer BAL unterzogen werden (66). An die Möglichkeit einer Pilzinfektion sollte immer dann gedacht werden wenn der Patient zu einer

Risikogruppen gehört und trotz antibiotischer Therapie keine Fiebersenkung zu erreichen ist.

Als Hilfestellung für die Diagnose wurden zum Beispiel von Ascioğlu et al 2001 (3) Diagnosekriterien für neutropenische Patienten mit Neoplasien sowie Empfänger einer Stammzelltransplantation aufgestellt. Unterteilt wird in sichere, wahrscheinliche und mögliche invasive Mykosen. Die Kriterien umfassen klinische Daten des Patienten, mikrobiologische Untersuchungsergebnisse, sowie die Ergebnisse bildgebender Verfahren.

1.3 Diagnostik Systemischer Mykosen

Insbesondere bei immunsupprimierten und multimorbiden Patienten ist die Diagnose von Pilzinfektionen zusätzlich erschwert, da die Patienten aufgrund ihres reduzierten Allgemeinzustandes oft keinen invasiven Untersuchungsmethoden unterzogen werden können (66).

Die klinischen Symptome sind unspezifisch und die Unterscheidung zwischen Kolonisation und Invasion ist schwierig weil Blutkulturen oft negativ bleiben. Für die Prognose der Patienten ist jedoch der frühe Zeitpunkt der Diagnosestellung und damit des Therapiebeginns von entscheidender Bedeutung.

Standard zur Diagnostik von Pilzinfektionen ist die mikrobiologische Untersuchung durch Anlegen einer Kultur.

1.3.1 Mikroskopie/ Histologie

In Nativpräparaten aus bronchoalveolärer Lavage, Trachealsekret, Sputum, Sinuslavage oder in Biopsaten sind mikroskopisch Hyphen und Sporen nachweisbar. Auch Candida – typische Pseudomycel, Blastosporen und Chlamydosporen können identifiziert werden. Diese Art des Nachweises ist

insbesondere für schnelle Diagnose von Haut – und Schleimhautinfektionen von Bedeutung. Für die Diagnostik systemischer Infektionen ist sie jedoch ungeeignet, da die Spezies nicht sicher identifiziert werden kann. Auch spezielle Färbemethoden erhöhen die Spezifität nicht entscheidend. Wichtig sind histologische Untersuchungen bei der Frage nach einer möglichen Organbeteiligung zum Beispiel der Leber.

1.3. 2 Pilzkulturen

Das Anlegen von Kulturen stellt zwar das Standardverfahren bei der Diagnostik systemischer Mykosen dar, führt jedoch gerade bei Blutkulturen oft zu falsch negativen Ergebnissen.

Es hat sich gezeigt, dass nur in 50% der Patienten mit Leber- und Milzbeteiligung bei einer Candidose positive Kulturergebnisse aufweisen (15), und auch Patienten mit einer gesicherten invasiven Aspergillose weisen in fast 100% der Fälle negative Blutproben auf (18). Bei systemischen Mykosen im Allgemeinen gelingt der kulturelle Erregernachweis in 25 – 60%(6).

Candida lassen sich am besten auf Sabouraud – Agar anzüchten. Er enthält Dextrose, Maltose, Antibiotika , Cycloheximid und weist einen initial niedrigen ph von 5.6 auf. Die Wachstumsdauer beträgt zwischen 1 – 3 Tagen (C.albicans, C.tropicalis, C.parapsilosis) und 4 – 9 Tagen (C. krusei , C.glabrata).

1.3.3 Candida – Antigentest

Die verfügbaren Antigentests weisen zum Beispiel Galaktomannan (Aspergilluszellwand) oder Candida - Zellwandkomponenten nach. Sie liefern jedoch keine quantitativen Ergebnisse und sind durch Kreuzreaktionen sehr störanfällig und wenig spezifisch. Die Sensitivität des Gallactomannantests liegt bei 70%, und auch andere Antigenassays sind nur in Kombination mit der Klinik verwertbar.

1.3.4 Candida – Antikörpertest

Im Vergleich zu den Antigentests verfügt der Antikörpertest zum Beispiel für Candida – AK über eine höhere Spezifität und Sensitivität. Jedoch ist die Aussagekraft bei neutropenischen Patienten aufgrund der Immunsuppression stark eingeschränkt.

1.3.5 Molekularbiologisch mittels Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine enzymatische Methode zur Amplifikation von DNA aus unterschiedlichen Materialien. Sie stellt die Grundlage für verschiedene molekulargenetische Nachweisverfahren dar. Durch die PCR kann mittels spezieller Primer die DNA aller klinisch relevanten Pilze amplifiziert werden. Durch real – time PCR – Verfahren wie den Lightcycler™ wiederum ist es möglich Pilze nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ nachzuweisen. Durch die Verwendung von spezifischen Sonden ist ein direkter Erregernachweis ohne nachgeschaltete Verfahren möglich.

1.3.6 Sequenzierung

Nach Amplifikation der DNA mittels konventioneller PCR kann die Basenabfolge zum Beispiel durch die Sequenzierungsmethode nach Sanger aufgeschlüsselt werden. Die so erhaltene Sequenz kann über die Genbank analysiert und der Erreger rasch ermittelt werden.

1.3.7 Bildgebende Verfahren

Bildgebende Verfahren wie Röntgenaufnahmen der Lunge oder ein CT der Leber können zwar Aufschluß über eine mögliche Organbeteiligung geben, sind jedoch für die Frühdiagnose ungeeignet. Sie werden erst in einem späten Krankheitsstadium diagnostisch aussagekräftig, und sind meistens nicht eindeutig zu beurteilen.

Bei einer Aspergillose mit Lungenbeteiligung beispielsweise können sogenannte „Halo“ – oder „crescent – of – air – Zeichen“ darstellbar sein (32). Eine Leberbeteiligung bei einer Invasiven Candidose kann durch eine scheckige Musterung des Organs sowie ein periportales Ödem gekennzeichnet sein.

1.4 Therapie systemischer Mykosen

Grundsätzlich gilt für den Einsatz von Antimykotika, dass sie in ausreichend hohen Dosierungen, möglichst früh und häufig auch empirisch eingesetzt werden sollten (9).

Zu den Antimykotika zählen Wirkstoffe aus der Klasse der Polyene, der Azole, Flucitosin sowie Caspofungin. Ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2 dargestellt.

Amphotericin B ist nach wie vor die wirksamste Substanz bei systemischen Mykosen, und daher trotz ihrer starken Nebenwirkungen unverzichtbar.

Flucitosin hat zwar wesentlich geringere Nebenwirkungen als Ampho B, Primärresistenzen und rasche Resistenzentwicklung machen jedoch meist die Kombination mit Amphotericin B notwendig. Die Kombination von Amphotericin B und Flucitosin hat weiter den Vorteil, dass die Toxizität von Amphotericin B durch die Dosisreduktion verringert, und der Synergismus beider Substanzen genutzt werden kann.

Neben Amphotericin B tritt zunehmend Fluconazol bei der Behandlung invasiver Mykosen in den Vordergrund, da es bei gleicher Wirksamkeit weniger Nebenwirkungen aufweist. Gegen eine Therapie mit Fluconazol spricht eine Vorbehandlung mit Azolen, resistente Stämme wie *Candida krusei* sowie der fehlende Ausschluss einer Aspergillose (10). Auch bei ZNS –

Beteiligung, Candida – Meningitis, Candida – Pneumonie, Candidemie bei instabilen neutropenischen Patienten und fieberhafter Neutropenie mit uncharakteristischen Lungeninfiltraten, ist Amphotericin B Mittel der Wahl (10).

Generell sollte bei neutropenischen Patienten bereits bei klinischem Verdacht eine antimykotische Therapie begonnen werden. Auch bei fiebernden neutropenischen Patienten ist nach 3-4 tägiger erfolgloser antibiotischer Therapie Amphotericin B indiziert (27,45,57,58).

Tabellen 2.1 – 2.4: Überblick über die gebräuchlichen Antimykotika bei Systemmykosen (36).

Tabelle 2.1 Polyene:

	Mechanismus	Spektrum	Resistenzen	NW	Applikation
Amphotericin B	Komplexbildung mit Ergosterol, dadurch Permeabilitäts-erhöhung: fungizid, fungistatisch	Candida spp Cryptococcus Aspergillus Mucor Histoplasma Coocidioides Blastomyces Sporothrix	Candida Lusitaniae, Candida guillier- mondii	Fieber, Schüttel- Frost, Übelkeit, nephro- toxisch, neuro- toxisch, Thrombo- phlebitis	lokal, i.v., intrathekal, intralumbal
Liposomales Amphotericin B	s.o., kolloidale Lösung wegen schlechter Wasserlöslichkeit	s.o.	s.o.	s.o.	i.v.

Tabelle 2.2 Flucitosin :

Besonderheit	Mechanismus	Spektrum	Resistenzen	NW	Applikation
--------------	-------------	----------	-------------	----	-------------

Schmalspektrum - antimykotikum ; meist komb. mit Amphotericin B	fungistatisch durch Hemmung der Nukleinsäuresynthese	Candida spp Cryptococcus Aspergillus	rasche Resistenz- entwicklung; Th. nur nach Antimykogramm	Selten Übelkeit, hepatotoxisch	i.v.
---	---	--	---	--------------------------------------	------

Tabelle 2.3 Azole:

	Mechanismus	Spektrum	Resistenzen	NW	Applikation
Itraconazol	Hemmung der Ergosterolsynthese fungistatisch	nahezu alle Pilze, bes. Aspergillose		Allerg.Reaktionen, Transaminasenanstieg, Steroidsynthesehemmung	oral
Fluconazol	s.o.	nahezu alle Pilze, bes. Candidose	Teilweise Candida albicans	s.o.	oral, i.v.
Voriconazol	s.o.	nahezu alle Pilze		s.o.	

Tabelle 2.4 Echinocandine:

	Mechanismus	Spektrum	Resistenzen	NW	Applikation
Caspofungin	Chitinsynthasehemmer	Gut wirksam gegen Candida und Aspergillus	Bisher keine Resistenzen bekannt	Übelkeit , Flush, Fieber, Venenreizung	i.v. ,oral

1.5 Candida – Infektionen

Da in der vorliegenden Arbeit klinische Proben intensivmedizinisch betreuter Patienten auf *Candida* – Infektionen untersucht wurden, soll im Folgenden speziell auf die Pathogenese solcher Infektionen eingegangen werden.

Die Gattung *Candida* gehört zu der Gruppe der Sprosspilze, und besitzt wie alle Pilze eine Zellwand aus Chitin und Hemicellulosen. Pilze zählen zu den Eukaryonten und sind heterotroph, das heißt sie sind nicht zur Photosynthese befähigt, sondern benötigen organisches Material als Nährstoffquelle. Ihre DNA ist von einer Plasmamembran umgeben, sie haben also einen Zellkern. Pilze können sich grundsätzlich entweder durch Sprossung (Sprosspilze) oder durch Hyphenwachstum (Fadenpilze) vermehren. Manche Pilze weisen einen Dimorphismus auf, das heißt sie liegen je nach Umweltbedingung in einer der beiden Formen vor. Diese Eigenschaft besitzen zum Beispiel *Candida albicans*, *Sporothrix* und *Histoplasma capsulatum*.

Hyphen sind verzweigte Pilzfäden, die durch Wachstum ohne Teilung zustande kommen. Eine Verschachtelung mehrerer Hyphen wird als Mycel bezeichnet.

Candida albicans bildet außerdem sogenannte Pseudomycel, die durch Längenwachstum der eigentlich rund – ovalen Zellen entstehen, und charakteristische Einschnürungen im Septumbereich aufweisen. Diese Eigenschaft ist für die mikroskopische Untersuchung von Interesse.

Die Abwehr des Immunkompetenten gegen Pilzinfektionen umfasst Haut, Schleimhaut, Mikroflora sowie die zelluläre Immunantwort, und ist in der Lage Pilzinfektionen abzuwehren. Kommt es aus unterschiedlichen Gründen zu einer Immunschwäche, entstehen oberflächliche, kutane, subkutane oder systemische Mykosen.

Hier spielt auch die Virulenz der Erreger eine Rolle. *Candida* verfügen über Adhärenzfaktoren, durch die sie an Epithelzellen, Endothelzellen, extrazelluläre Matrixproteine und an das C3b – Molekül des Komplementsystems binden können. Es handelt sich hierbei um Mannoproteine der äußeren fibrillären Zellschicht, um Fimbrienadhäsine / Pili, oder Intergrin - Adhäsine (50). Auch der Dimorphismus trägt zur Virulenz bei. Je nach Umweltbedingung kommt es zur phänotypischen Variation, zum

Auftreten verschiedener Morphologieformen. Außerdem sind Candida mit Phospholipasen und SAPs (sekretorische saure Proteinase) ausgestattet. Diese Enzymausstattung ist entscheidend für die Vermeidung von Wirts – Abwehrmechanismen (durch Abbau von Komplementproteinen und Immunglobulinen), für die Stickstoffversorgung, und für die Adhärenz (50). Außerdem sind Candida mittels Fibrinogenbindungsfaktoren zur Immunmodulation in der Lage.

Candida albicans kommt physiologischerweise in niedriger Keimzahl in der Rachen-, Darm- und Genitalschleimhaut vor. Durch Keimzahlerhöhung kann es zu lokalen Krankheitserscheinungen kommen. Dazu zählen neben dem Neugeborenensoor Mykosen bei Erwachsenen wie der Mundsoor, Ösophagitis, Vaginitis, Balanitis, Hautsoor, chronisch – mukocutane Candidosen, Infektionen von Hautanhangsgebilden, und Organmanifestationen wie Zystitis, Pneumonie und intestinaler Soor. Bei immungeschwächten Patienten können diese lokalen Infektionen in eine generalisierte Infektion übergehen. Der Erreger wechselt hierbei von seiner ursprünglich saprophytären Lebensweise zum Parasitismus.

Durch den fakultativ pathogenen Erreger entsteht eine endogene Infektion, die Soorsepsis, mit Komplikationen durch Absiedelung in Niere, Nebenniere, Augen, Herzklappen.

1.6 Zielsetzung

Der entscheidende Faktor für die Prognose von Patienten mit einer systemischen Mykose sind der Zeitpunkt des Therapiebeginns und die Wahl des richtigen Antimykotikums.

Zwar kann man schon bei einem geringen klinischen Verdacht eine kalkulierte antimykotische Therapie initiieren, man geht dabei jedoch insbesondere bei Amphotericin B ein hohes Nebenwirkungsrisiko ein, und ist nicht sicher ob der Erreger nicht unerwartete Resistenzen aufweist.

Eine möglichst schnelle und erregerspezifische Diagnostik erleichtert also nicht nur die Entscheidung zur Therapie, sondern ermöglicht auch von Anfang an den Einsatz des richtigen Medikaments.

Es stehen heute neben dem Standardverfahren, der mikrobiologischen Kultur, molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Candida – DNA zu Verfügung, die eine schnellere Diagnose ermöglichen sollen.

Diese molekularbiologischen Nachweismethoden basieren alle zum einen auf der Extraktion der DNA aus klinisch relevanten Materialien und zum anderen auf der Amplifikation der DNA durch eine Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR).

Für die Extraktion stehen neben manuellen Protokollen inzwischen automatisierte Verfahren zur Verfügung (49).

Statt konventioneller PCR – Protokolle kann die Amplifikation auch in einem Arbeitsgang zusammen mit der Detektion und Quantifizierung der DNA durch eine real – time PCR durchgeführt werden (44). Ein solches Real – time PCR Gerät stellt der für die vorliegenden Untersuchungen verwendete LightCycler™ dar.

Auch andere molekularbiologische Nachweisverfahren basieren auf der DNA -Amplifikation durch PCR Verfahren. Die Detektion der DNA erfolgt dann in einem getrennten Arbeitsschritt wie zum Beispiel durch Gelelektrophorese, die PCR – ELISA Methode oder mit Hilfe von Sequenzierungsgeräten.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Methoden anhand unterschiedlicher klinischer Materialien mit der Standardmethode, der mikrobiologischen Untersuchung durch Anlegen einer Kultur, zu vergleichen.

Bei den Routineuntersuchungen, die bei den intensivmedizinisch betreuten Patienten durchgeführt wurden, handelt es sich um das Anlegen von Kulturen insbesondere von Trachealsekret, Sputum, abdominellem Drainagematerial, Katheterurin und Vollblut.

Die 94 untersuchten Proben teilen sich auf in 38 Proben aus dem oberen Respirationstrakt, 18 Proben aus dem Bauchraum, 25 Vollblutproben und 13 Katheterurinproben. Alle Proben wurden zuerst in einen PCR – ELISA eingesetzt, und das gleiche PCR – Produkt mit dem Lightcycler™ untersucht. Danach wurde nach einer weiteren PCR eine Gelelektrophorese angefertigt und das restliche Material mittels Sequenzierung untersucht.

Parallel zu diesen Untersuchungen gingen Proben derselben Materialien innerhalb der Routinekontrolle an das Mikrobiologische Institut Tübingen und wurde dort durch Anlegen von Kulturen mikrobiologisch untersucht.

Außerdem wurden 6 Vollblutproben gesunder Probanden mit *Candida albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.lusitaniae*, *C.parapsilosis* oder *C.tropicalis* versetzt und ebenfalls untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 DNA - Extraktion mit dem QIAamp DNA Tissue – Kit

Zur Extraktion der DNA werden 10 ml der Probe mit RCLB Puffer auf 45 ml aufgefüllt und 10 Minuten auf der Wippe durchmischt. Danach wird für 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen / Minute zentrifugiert und der Vorgang wiederholt. Der Überstand wird verworfen, das Pellet resuspendiert sowie 1ml WCLB zugegeben. Nun wird für 45 Minuten bei 65°C inkubiert und erneut für 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen / Minute zentrifugiert. Wiederum wird der Überstand verworfen und 500µl Lyticase zugegeben, sowie für weitere 45 Minuten bei 37° inkubiert. Anschließend wird bei 4000 Umdrehungen / Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Danach werden die Proben in 180µl ATL Puffer (Tissue Lysis Puffer) und 20µl Proteinase K aufgenommen um für 20 Minuten inkubiert zu werden. Darauf gibt man 200µl AL Puffer (Lysis Buffer) hinzu, inkubiert nochmals für 10 Minuten und mischt die Proben mit 210µl Ethanol. Nach dem Vortexen wird der Ansatz in die Quiagen-Säulen pipettiert. Jetzt wird mit 9000 Umdrehungen /Minute für 1 Minute zentrifugiert und mit 500µl AW1-Waschpuffer gewaschen, sowie für 1 Minute bei 9000 Umdrehungen/ Minute abzentrifugiert. Danach wird zwei Mal mit 500µl Waschpuffer gewaschen und jeweils wieder abzentrifugiert. Nun werden 50µl AE- Puffer auf die Säulen gegeben und für 1 Minute bei 9000 Umdrehungen/ Minute zentrifugiert. Die Zentrifugation wird nach erneuter Zugabe von 50µl AE-Puffer mit 13000 Umdrehungen / Minute wiederholt. Die so gelöste DNA kann mittels photometrischer Messung auf Konzentration und Reinheit geprüft werden.

Die verwendeten Puffer zur Aufreinigung der DNA werden vom Hersteller des QIAamp Tissue Kit geliefert.

2.1.2 Konventionelle PCR und PCR – Elisa

Die extrahierte DNA aller Proben wurde einer etablierten PCR (43) zugeführt. Diese Amplifikationsreaktionen wurden mit denselben Primern durchgeführt, die auch für die LightCycler™ – PCR genutzt werden. Es handelt sich um

sequenzspezifische Primer, die komplementär zum 18 ssu rDNA Gen sind. Die hohe Sensitivität dieser Primer ist dadurch bedingt, dass dieses multi – copy Gen in einer hochkonservierten Region des fungalen Genoms liegt. Es handelt sich außerdem um universelle Primer, mit deren Hilfe sehr viele Pilzspezies amplifiziert werden können.

Primersequenzen:

Forward – Primer: 5' – ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG – 3' , Tm:65.5°C

Reverse – Primer: 5' – CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG – 3' , Tm 64.5°C

Die Amplifikation der Pilz – DNA zum Nachweis im ELISA wird mit einem Kit durchgeführt, der Digoxigenindesoxyuraciltriphosphat in einer Konzentration von 0.1 mM enthält. Dies dient der Markierung der Amplifikate, die nun durch Oligonukleotidsonden nachgewiesen werden können.

Der eingesetzte PCR Mix ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: PCR Mix

<u>Material</u>	<u>Volumen (µl)</u>
H ₂ O, steril	5
10 – fach Puffer	27,2
MgCl ₂ (25 mM)	2
Desoxyadenintriphosphat (200 µM)	1
Desoxyguanosintriphosphat (200 µM)	1

Desoxycytidintriphosphat (200 µM)	1
Desoxythymidintriphosphat (200 µM)	1
Digoxigenindesoxyuracyltriphosphat (10 µM)	1
Forward Primer (24 µM)	0.25
Reverse Primer (24 µM)	0.25
Taq Polymerase	0.3
DNA	10

Hieraus ergibt sich ein Gesamtvolumen von 50 µl, das in die PCR eingesetzt wird.

Die Herstellung des 10 – fach Puffers zeigt Tabelle 4, das Temperaturprofil Tabelle 5.

Tabelle 4: Zusammensetzung des 10 – fach Puffers für die PCR

<u>Material</u>	<u>Konzentration (mM)</u>
Tris, pH 8.3	10
Kaliumchlorid	50
Magnesiumchlorid	1

Tabelle 5: Temperaturprofil PCR

<u>Prozess</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
Initialdenaturierung	4 min	94 °C
Amplifikation		
Denaturierung	30 sec	94 °C
Annealing	60 sec	62 °C
Elongation	120 sec	72 °C
Terminale Extension	5 min	72 °C

Hierbei laufen 34 Zyklen in einer Gesamtdauer von 3 Stunden ab. Wenn die PCR abgelaufen ist, wird die DNA denaturiert indem 20 µl Amplifikat mit 20 µl

Denaturierungslösung vermischt werden. In dieser Hybridisierungslösung sind biotinylierte Oligonukleotide enthalten. Nun werden 200 µl des Gesamtvolumens in eine Mikrotiterplatte überführt, deren Boden mit Streptavidin beschichtet ist und bei 37 °C für 2.5 Stunden inkubiert. Die digoxigeninmarkierte DNA wird als Kontrolle mitgeführt und kann mittels einer biotinmarkierten Kontrollsonde nachgewiesen werden.

Nach der Inkubation wird die Mikrotiterplatte dreimal mit einer Waschlösung gewaschen. Anschließend wird eine Digoxigenin – Antikörperlösung zugegeben und erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nun folgt eine sechs Malige Waschung und die Zugabe von 200 µl 2.2 Azino–di–3-ethylbenzthiazolin – Lösung sowie eine erneute Inkubation für 30 min bei 37 °C.

Jetzt kann die Intensität in einem ELISA – Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm und einem Referenzfilter von 492 nm gemessen werden.

2.1.3 Real – time PCR mit dem Lightcycler

Um die LightCycler™ PCR zu starten, werden die extrahierte DNA und der in Tabelle 6 beschriebene Master Mix in gekühlte LightCycler™ Glaskapillaren pipettiert und bei 110g abzentrifugiert. Dann kann das Probenkarusell in den das LightCycler Instrument eingesetzt und die Amplifikation gestartet werden. Abbildung 1 zeigt das LightCycler™ Instrument:



Tabelle 6: Master – Mix für die LightCycler™ - PCR

<u>Inhaltsstoff</u>	<u>Volumen (µl)</u>	<u>Konzentration</u>
DNA	10.0	
Fluoreszein Sonde (30 µM)	1.0	3 mM
LC – Red – 640 Sonde (30 µM)	1.0	3 mM
MgCl ₂ (25 mM)	2.4	3 mM
LightCycler Fast Start DNA Master Hybridisation Probes	2.0	
Forward Primer (24 µM)	0.0625	0.07 µM
Reverse Primer (24 µM)	0.0625	0.07 µM
H ₂ O, steril	3.475	

In Tabelle 7 ist das Temperaturprofil der ablaufenden PCR während der 45 Zyklen dargestellt.

Tabelle 7: Temperaturprofil der LightCycler™ - PCR

Prozess		Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung		9 min	95°C
Amplifikation	Denaturierung	15 sec	95°C
	Annealing	10 sec	58°C
	Elongation	20 sec	72°C
Anzahl der Zyklen : 45			
Gesamtdauer: 45 min			

2.1.3.1 Die Lightcycler – Sonden und Primer

Die PCR mit dem LightCycler™ ermöglicht es, den Amplifikationsvorgang direkt über die Software zu verfolgen. Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit die amplifizierte DNA gleichzeitig zu quantifizieren. Um dies zu ermöglichen wird der Fluoreszenz – Resonanz – Energie – Transfer genutzt (Abbildung 2).

Er wird ermöglicht durch zwei sequenzspezifische Hybridisierungssonden, die innerhalb der amplifizierten Genregion binden und mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind.

Common Candida Sondenpaar:

3' FL: 5' – CCA Agg ACg TTT TCA TTA ATC AAg A - Fluoreszein – 3'

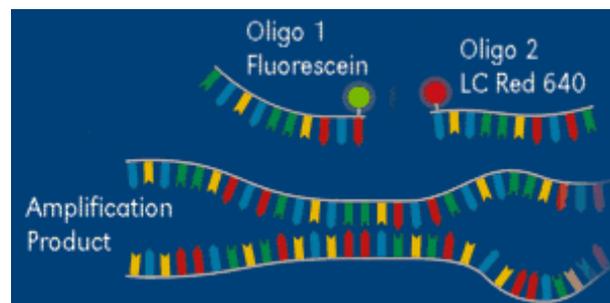
5' LC: 5' - RED 705 – CgA AAg TTA ggg gAT CgA AgA Tg - 3'.

Diese Sonden binden während der Annealingphase im Abstand einer Base innerhalb der Zielsequenz auf dem Einzelstrang.

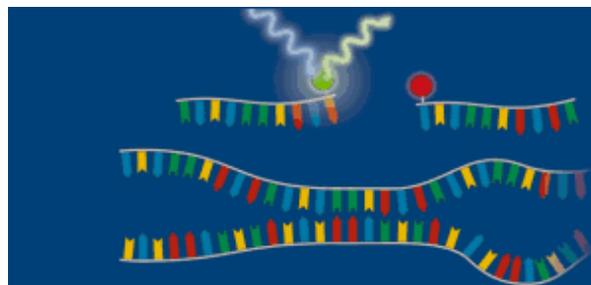
Nur so kann die 3' fluoreszenzmarkierte Sonde nach Anregung durch eine interne blaue Lichtquelle grünes Licht aussenden, welches die 5' Red 705 markierte Sonde zur Emission von rotem Licht einer Wellenlänge von 705 nm anregt. Dieses rote Licht wird im optischen System des LC™ am Ende der Annealingphase gemessen.

Während der Elongation werden die Sonden jeweils wieder von den Strängen getrennt.

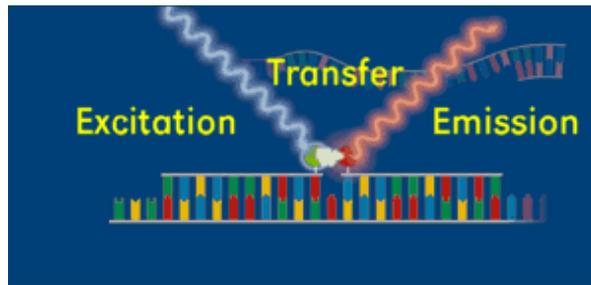
Abbildung 2: Darstellung des Fluoreszenz – Resonanz - Energietransfer



Darstellung der Denaturierung und der markierten Sonden



Darstellung der Annealingphase.



Darstellung der Elongationsphase, in der die Sonden wieder frei werden.

2.1.3.2 Dokumentation und Schmelzkurvenanalyse mit dem Lightcycler

Die Schmelzkurvenanalyse dient der Speziesdifferenzierung und schließt sich an die Amplifikation an. Da universelle Pilzprimer verwendet worden sind, ist es notwendig festzustellen ob mehrere Amplifikationsprodukte entstanden sind. Die Sonden hybridisieren zwar auch mit Amplifikaten, die nicht in jeder Base komplementär sind, aber sie schmelzen dann schon bei niedrigeren Temperaturen wieder ab. Dieser Vorgang soll durch die Schmelzkurvenanalyse nachgewiesen werden.

2.1.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, mit dem PCR Produkte in einem Agarosegel nachgewiesen werden können. Dies funktioniert durch Anlegen einer Spannung an das sich in einer TAE Pufferlösung befindende Agarosegel. Die Zusammensetzung des TAE Puffers ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Zusammensetzung des TAE Puffers

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris pH 7.5	2M
Essigsäure 96%	2M
EDTA	0.1M

Das Agarosegel wird mit 2g Agarose, 10 µl Gelstar und 100ml 1x TAE Puffer hergestellt. Das Gelstar verfügt über DNA - interkalierende Substanzen und kann durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Es werden 10 µl Amplifikationsprodukt mit 2.5 µl 5x Laufpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 9) versetzt und in die Taschen des auspolymerisierten zwei Prozentigen Agarosegels pipettiert. Um die Amplifikate aufzutrennen wird Gleichstrom einer Spannung von 70 – 100 V und 85 – 125 mA für 90 bis 120 min angelegt. Die Dokumentation des Ergebnisses erfolgt durch Fotografie unter UV – Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm.

Tabelle 9: Zusammensetzung des 5x Laufpuffers

Inhaltsstoff	Konzentration
Tris pH 7.6	50 mM
EDTA	50 mM
Natriumdodecylsulfat	0.5%
Bromphenolblau	0.1%

2.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung des gewonnenen PCR – Produkts wurde von Henrik Scholl von der Abteilung für experimentelle Ophthalmologie der Universitäts – Augenklinik unter der Leitung von PD Dr. Bernd Wissinger durchgeführt.

Dabei wurde das Verfahren der DNA – Sequenzierung nach Sanger angewandt. Es handelt sich hierbei um die sogenannte Kettenabbruchmethode, das heißt sie beruht auf dem spezifischen Abbruch von neupolymerisierten DNA – Strängen an einem der vier Nukleotide.

Die zu sequenzierende DNA wird als Template – Molekül benutzt und mit Hilfe einer Polymerase (Klenow – Fragment der Polymerase I, T7 Polymerase oder Taq – Polymerase) neusynthetisiert. Begonnen wird die Synthese an kleinen 20 – 24 Nukleotide langen Primern, das 5' Ende bildet das feste Ende aller neusynthetisierten Primer. Die Primer sind entweder radioaktiv oder mit einer fluoreszierenden Substanz markiert.

Es werden für Adenin, Cytosin, Guanin und Thyrosin vier verschiedene Reaktionen durchgeführt, wobei es bei jeder Reaktion nukleotidspezifisch zu Syntheseabbrüchen kommt.

Die Sequenzierungsreaktionen enthalten die einzel- oder doppelsträngige DNA die sequenziert werden soll, den markierten Primer, die DNA – Polymerase, dATP, dCTP, dGTP, dTTP und jeweils ein ddNTP. Die Konzentration der ddNTPs ist gegenüber den dNTPs sehr niedrig, wodurch in jeden neusynthetisierten Strang im Durchschnitt nur an einer einzigen Position ein ddNTP eingebaut wird. Da den Didesoxynukleotiden an der 3' Position der Ribose die OH – Gruppe fehlt, kann nach ihrem Einbau kein weiteres Nukleotid mehr angeknüpft werden, und es kommt zum Kettenabbruch. Dabei sind die Reaktionsbedingungen so eingestellt, dass jedes Fragmentmolekül im Durchschnitt nur einmal getroffen wird.

Nach der Neusynthese der DNA – Fragmente in den vier verschiedenen Reaktionsansätzen erhält man vier Fragmentgemische. Das eine Ende der Fragmente ist jeweils durch das 5' Ende des Primers bestimmt, das zweite entspricht der Abbruchstelle durch das ddNTP.

Um die Fragmentgemische darzustellen werden sie auf ein hochauflösendes Polyacrylamidgel aufgebracht und aufgetrennt. Da die Synthese in 5' nach 3' Richtung erfolgt ist, zeigen die kürzeren Fragmente die Sequenz in der Nähe des Primers an. Man kann nun die Sequenz direkt in 5' nach 3' Orientierung ablesen.

Die hierbei verwendeten Primer entsprechen den Primern die für die anderen Methoden verwendet wurden.

2.1.6 Mikrobiologische Untersuchung

Die Mikrobiologische Untersuchung der Proben fand im Rahmen der üblichen therapiebezogenen Diagnostik statt und wurde vom Mikrobiologischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Die Blutkulturen wurden auf Bactec Medium, einer Bouillon, angelegt und für 24h bei 37°C sowie für 6 Tage bei Raumtemperatur bebrütet.

Für Urinkulturen werden 10µl auf Sabourand Glucose Agar ausplattiert und unter den gleichen Konditionen bebrütet.

Trachealsekret, Abdominelle Abstriche sowie abdominelles Drainagematerial werden ebenfalls auf Sabourand Agar auf die gleiche Weise bebrütet.

Nach 24h wird ein vorläufiger Befund formuliert, dem nach weiteren 6 Tagen der endgültige Befund folgt.

2.1.7 Verdünnungsreihen

PCR – Prozessor Gene Amp 2400
Vortex Mixer
Vortex Genie 2
LC Caroussel Centrifuge
Photometer LS 500
BioPhotometer
Variopetten
Gel Casting systems
Sartorius Universalwaage

Perkin Elmer, Foster City, USA
NeoLab®
Bender & Hobein, Rottenburg
Roche Diagnostics, Mannheim
Dr. Lange, Berlin
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Life Technologies, USA
Sartorius AG

2.2.2 Enzyme, Primer, Gensonden

Bezeichnung

Primer
LightCycler™ Sonden
Proteinase K
Lyticase
DATP, dCTP, dGTP, dTTP

Hersteller

Roth, Karlsruhe
TIB MOLBIOL, Berlin
Roche Diagnostics, Mannheim
Sigma Deisenhofen
Pr5omega, Madison, USA

2.2.3 Verbrauchsgegenstände

Bezeichnung

Lightcycler – Capillaries
LightCycler™ - FastStart DNA
Master Hybridisation Probes
Lightcycler™ Kits
PCR – ELISA Kit (DIG – Labeling)
PCR – ELISA (Dig Detection)
PCR Master

Hersteller

Roche Diagnostics, Mannheim
Roche Diagnostics, Mannheim

2.2.4 Chemikalien

Bezeichnung

Ethanol
Ampuwa
Red Cell Lysis Buffer (RCLB)
White Cell Lysis Buffer (WCLB)

Hersteller

Merck, Darmstadt
Fresenius, Bad Homburg
Roche Diagnostics, Mannheim
Puffer: Universitätsapotheke Tübingen

2.3 Patientenproben

Es wurden 94 Proben von 31 intensivmedizinisch betreuten Patienten untersucht, die zwischen September 2002 und März 2003 gewonnen wurden. Die Probenanzahl pro Patient variiert zwischen 1 und maximal 10 Proben. Das Patientenkollektiv ist sehr heterogen, es sind die meisten der oben genannten Risikogruppen vertreten. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die den Behandlungsgrund und relevante Grunderkrankungen beziehungsweise Risikofaktoren.

Tabelle 10 : Überblick über das Patientenkollektiv

<u>Patient</u>	<u>Alter, Erkrankungen, invasive Therapie</u>	<u>Antimykotische Therapie</u>
1	- 72 jähriger P. - Colitis ulcerosa Z.n.Sigmaresektion bei Perforation, Z.n. Relaparatomie bei Abszess, Z.n.Colektomie, Z.n. Dünn – darmperforation - Multiorgandysfunktion - verstorben im septischen Schock	Caspofungin
2	- 24 jähriger P. - Polytrauma	
3	- 76 jähriger P. - Aortenstenose, Z.n. ACVB und Aortenklappen - ersatz, Z.n.Rethorakotomie bei Perikardtampnade und Nachblutung - Tinea pedis beidseits	
4	- 65 jähriger P. - gedeckt rupturiertes AA - Sigmaperforation , Peritonitis, Pankreatitis	Diflucan vom 6.10.02 – 20.11.02

5	<ul style="list-style-type: none"> - 66 jährige P. - Polytrauma mit Z.n. Langzeitbeatmung - Z.n. rezidivierenden septischen Schüben; dringen - der Verdacht auf systemische Mykose mit hepatischer Beteiligung; passager dialysepflichtiges Nierenversagen - Spondylodiszitis L3/L4 mit Nachweis von Candida DNA durch Sequenzierung 	<p>Diflucan vom05.09.02 – 06.09.02, vom17.09.02 – 25.09.02</p> <p>Ampho B vom07.09.02 – 16.09.02</p> <p>Caspofungin vom25.09.02 – 06.11.02, vom 08.09.02 – 15.11.02</p> <p>Voriconazol ab 08.02 03</p>
6	<ul style="list-style-type: none"> - 77 jähriger P. - Z.n. Duodenalleckage - Z.n. nekrotisierender Pankreatitis mit Bursaabszess 	
7	<ul style="list-style-type: none"> - 79 jähriger P. - rupturiertes Bauchaortenaneurysma - Gastrointestinalblutung - Sepsis mit akutem passager dialysepflichtigem Nierenversagen ; nekrotisierende Pankreatitis 	Ampho B vom 01.11.02 – 15.11.02
8	<ul style="list-style-type: none"> - 68 jähriger P. - Septischer Schock nach Duodenalperforation bei Z.n. Laparoskopischer Cholezystektomie - Nekrotisierende Faszitis - Multiorganversagen mit ARDS, akutem Nieren - versagen und Kreislaufstillstand 	Diflucan Ampho B
9	<ul style="list-style-type: none"> - 72 jähriger P. - Z.n. ACVB, postoperativ respiratorische Insuffizienz - Instabiles Sternum und Mediastinitis - postoperatives akutes Nierenversagen - Diabetes mellitus Typ II - Adipositas 	
10	<ul style="list-style-type: none"> - 63 jähriger P. - Akute Typ A Dissektion der Aorta - Z.n. Dünndarmteilresektion bei Infarzierung 	
11	<ul style="list-style-type: none"> - 68 jähriger P. - Z.n. Apoplex und Hemicranektomie - Diabetes mellitus 	
12	<ul style="list-style-type: none"> - 69 jähriger P. - Z.n. transnasaler Prolaktinom – Entfernung mit postoperativem subduralem Hämatom 	

13	<ul style="list-style-type: none"> - 39 jähriger P. - Z.n. Resektion eines temporoparietalen Cavernoms postoperativ Entwicklung eines Status epilepticus 	
14	<ul style="list-style-type: none"> - 18 jährige P. - Polytrauma 	
15	<ul style="list-style-type: none"> - 54 jährige P. - Leberruptur bei Z.n. Lyse bei fulminanter Lungen - embolie und Reanimation - Heparin – induzierte Thrombozytopenie Typ II 	
16	<ul style="list-style-type: none"> - 62 jähriger P. - Intracranielle Blutung 	
17	<ul style="list-style-type: none"> - 53 jähriger P. - offenes SHT, Mittelgesichtsfrakturen - Diabetes mellitus 	
18	<ul style="list-style-type: none"> - 63 jährige P. - Aortendissektion 	
19	<ul style="list-style-type: none"> - 49 jährige P. - Terminale Niereninsuffizienz infolge Transplantat - abstoßung bei Z.n. Nieren/ Pankreastransplantation - Diabetes mellitus Typ I - Z.n. Azathioprin – induzierter Leukopenie 	
20	<ul style="list-style-type: none"> - 68 jährige P. - Z.n. Aortenklappenersatz, Mitalklappenersatz - Diabetes mellitus, Adipositas - Cholezystolithiasis 	
21	<ul style="list-style-type: none"> - 51 jähriger P. - Dissektion A.carotis interna re. mit ausgedehntem Mediainsult - M.Crohn 	
22	<ul style="list-style-type: none"> - 66 jähriger P. - Apallisches Syndrom bei Z.n. SHT bei epilept. Anfall - Rez. Pneumonien mit septierten Pleuraergüssen und Thoraxempyem, Z.n. Spontanpneu, COPD - Multiorganversagen bei septischem Schock aufgrund Infektion mit gramnegativen Erregern 	
23	<ul style="list-style-type: none"> - 71 jähriger P. - Z.n. Meningeom - Excirpation - Exitus letalis - MRSA – Infektion - Adipositas 	

24	- 72 jährige P. - Z.n. Keilbeinmeningeom – Entfernung	
25	- 45 jähriger P. - Spontane Ponsblutung - Exitus letalis bei cerebraler Dysregulation	
26	- 65 jähriger P. - Intracerebrale Blutung unter Marcumar - Dekubitus Steiß - Adipositas	
27	- 65 jähriger P. - Septischer Schock mit Multiorganversagen nach spontaner Ösophagusruptur, Duodenal – nekrosen - Nikotin – und Alkoholabusus	
28	- 47 jähriger P. - Z.n. nach Hüftkopfresektion re. nach Empyem - Z.n. Lebertransplantation bei Zirrhose - Candida – Sepsis, Candida - Pneumonie - Niereninsuffizienz - Portale Hypertonie - Z.n. ösophagealer Varizenblutung - Panzytopenie	Diflucan Voriconazol
29	- 61 jähriger P. - akute Dyspneu bei unklarem Oropharynxtumor	
30	- 80 jährige P. - Subarachnoidalblutung - Diabetes mellitus, insulinpflichtig - verstorben an den Folgen der SAB	
31	- 71 jährige P. - Platzbauch und Anastomoseninsuffizienz der Ilio – coecalnaht bei Z.n. nekrotisierender Appendizitis - lokale Peritonitis, Septischer Schock - Akutes Nierenversagen - latenter Diabetes mellitus	

Im Folgenden sollen einige der Patienten genauer besprochen werden.

Patient 4:

Es handelt sich um einen 65 jährigen Patienten mit einer Fettstoffwechselstörung, einer Hypertensiven Herzerkrankung sowie einer

Aortenklappeninsuffizienz mit Z.n. Aortenklappenersatz vor 5 Jahren. Aktuell behandelt wurde der Patient wegen einer Typ – B – Dissektion der Aorta, die operativ mit einer Aortobifemuralen Y – Prothese versorgt wurde. Am 5. postoperativen Tag stiegen die Infektionszeichen stark an, im CT zeigte sich eine Sigmaperforation, die operativ durch eine Sigmaresektion therapiert wurde. Weiter zeigte sich eine ausgeprägte Vierquadrantenperitonitis sowie Nekrosen des Zökums und des Colon ascendens. Am nächsten Tag folgte eine Splenektomie bei Milzruptur. In den folgenden 6 Wochen fanden weitere Relaparatomien mit Spülung, Drainageanlage und Abtragung von Nekrosen statt. Es entwickelten sich außerdem eine schwere Pankreatitis sowie ein Bauchwanddefekt. Bei den Mikrobiologischen Untersuchungen wurden im Intraabdominellen Abstrich *E. faecalis*, *E. faecium*, *Candida albicans* (ab 5.10.02) , *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebakterium spp* nachgewiesen. In Trachelsekret und BAL fand sich mehrfach *C. albicans* sowie am 6.12.02 *Pseudomonas aeruginosa*. Im Katheterurin wurde am 23.10.02 ebenfalls *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen. Therapiert wurde die Peritonitis anfangs mit Vancomycin und Meropenem, später zusätzlich mit Diflucan. Im weiteren verlauf wurde auf Tazobac, Ciprobay und Diflucan umgesetzt , am 20.11. konnte die Therapie beendet werden, musste jedoch am 27.11.02 mit Meropenem und Vancomycin wieder begonnen werden. Die urogenitale Infektion wurde mit Fortum behandelt.

Im weiteren Verlauf entwickelte sich ein Defekt im Duodenum, der nicht verschlossen werden konnte, der Patient verstarb am 9.12.02 durch ein septisches Multiorganversagen.

Patient 5:

Es handelt sich um eine 66 jährige Patientin, die nach einem Verkehrsunfall am 20.06.02 vom 05.09.02 bis zum 10.02.03 intensivmedizinisch betreut wurde.

Nach zunächst günstigem Krankheitsverlauf entwickelten sich rezidivierende septische Phasen mit *Candida albicans* Nachweis in Blutkulturen am 9./10.8.02 und 15.08.02. Ein passager dialysepflichtiges Nierenversagen bestand vom 8.8.02 bis zum 18.8.02.

Bei der Aufnahme am war die Patientin aufgrund respiratorischer Insuffizienz tracheotomiert

Es bestand ein posttraumatischer Hydrozephalus aresorptivus nach SHT, der eine Shuntanlage notwendig machte; am 24.11.02 kam es zur Abszessbildung in der Nähe des abdominalen Shuntteils, der daraufhin ausgetauscht wurde.

Außerdem wurde am 11.10.02 eine Lungenarterienembolie diagnostiziert, und zwei ältere Hirninfarkte festgestellt. Außerdem ereigneten sich Thrombosen der V.cava sup., der V.brachiocephalica und der V.subclavia li.

Die Patientin entwickelte rezidivierende septische Schübe mit positiven Blutkulturen für *C.albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*. Es bestand der dringende Verdacht auf eine systemische Mykose mit hepatischer Beteiligung bei morphologischen Leberveränderungen im CT vom 06.09.02, die mit einer *Candida* – Infektion vereinbar sind.

Antimykotisch behandelt wurde vom 05.09.02 – 06.09.02 mit Diflucan, vom 07.09.02 – 16.09.02 mit Ampho B, vom 17.09.02 – 25.09.02 mit Diflucan, vom 25.09.02 – 06.11.02 sowie vom 08.11.02 – 15.1.02 mit Caspofungin. Seit dem 08.02.03 wurde bis zur Verlegung mit Voriconazol therapiert, da sich in einer CT – gesteuerten Punktion der LWK 3/4 *Candida albicans* DNA durch Sequenzierung nachweisen lies.

Patient 7:

Der 79 jährige Patient wurde nach Implantation einer Y – Prothese bei einem rupturierten BAA zur postoperativen Betreuung aufgenommen und vom 24.09.02 bis zum 17.01.03 intensivmedizinisch versorgt. An Grunderkrankungen sind eine KHK mit Z.n. ACVB 1998 und eine Art. Hypertonie zu nennen. Postoperativ wurde ein retroperitoneales Hämatom

diagnostiziert, es kam bei rezidivierenden septischen Schüben zu einer nekrotisierenden Pankreatitis. In den Mikrobiologischen Blutkulturen fanden sich am 04.10.02 Propioni – Bakterien und am 22.10.02 Staphylococcus epidermidis.

Am 31.10.02 und 2.11.02 wurde im operativen Abdomenabstrich Candida glabrata nachgewiesen, ebenso wie am 31.10.02 in der BAL. Außerdem fanden sich am 02.11.02 Enterococcus faecalis im operativen Abdomenabstrich und am 20.11.02 Staphylococcus epidermidis sowie Enterococcus faecium im Abstrich der Bauchwunde.

Am 05.12.02 wurde in im Punktat eines retroperitonealen Hämatoms Stenotrophomonas maltophilia und C.glabrata nachgewiesen.

Vom 1.11.02 – 15.11.02 wurde antimykotisch mit Ampho B therapiert. In Blutkulturen konnte C.glabrata zu keiner Zeit nachgewiesen werden.

Patient 8:

Der 68 jährige Patient wurde nach einer laparoskopischen Cholezystektomie wegen einer Duodenalperforation, einer nekrotisierenden Faszitis und diversen Einblutungen mehrmals revidiert.

Die Mikrobiologischen Untersuchungen intraabdomineller Proben wiesen ab 02.03.03 E.coli sowie mehrfach Klebsiella oxytoca sowie Ent. Faecalis und Ent. faecium nach. Ab 05.03.03 wurde mehrfach C.albicans nachgewiesen sowie ab 07.03.03 mehrfach Acinetobacter baumannii an der Flanke. Acinetobacter baumannii lies sich am 15.03.03 auch am ZVK nachweisen. Für E.coli positive Blutkulturen gab es am 02.03.03 , C.albicans lies sich am 1.03.03 in der Blutkultur anzüchten. Im Trachealsekret lies sich C.albicans ab 03.03.03 mehrfach nachweisen.

Ab dem 08.03.03 wurde zusätzlich zur antibiotischen Therapie mit Diflucan therapiert, und am 17.03.03 auf Ampho B umgesetzt. Am 23.03.03 kam zur akuten Schocksymptomatik und der Patient verstarb durch septisches Multiorganversagen.

Patient 20:

Es handelt sich um eine 68 jährige Patientin mit einer Gerinnungsstörung unklarer Genese, Diabetes mellitus II und einer diabetischen Nephropathie. Nach einem Aorten – und Mitralklappenersatz am 13.12.02 und einem kardiogenen Schock bei Perikardtamponade am 19.12.02 wurde die Patientin erneut zur intensivmedizinischen Betreuung aufgenommen. Aufgrund hoher Infektparameter und der Notwendigkeit einer Rethorakotomie wurde eine kalkulierte Antibiose mit Levofloxacin durchgeführt. Am 30.12.02 ließ sich *C.glabrata* im TS, Katheterurin und an den Schrittmachersonden nachweisen, worauf bis zum 02.01.03 mit Fluconazol und danach wegen des Nachweises von *Paecilomyces lilacinus* an Thoraxdrainage, Sternum und Schrittmachersonde mit Caspofungin therapiert wurde. Am 17.01.03 wurde wegen Resistenzentwicklung ein Wechsel auf Voriconazol notwendig. Auch die antibiotische Therapie musste wegen des Nachweises von *Cryseobacterium meningosepticum* und *Ent. faecium* in der BAL mehrfach umgestellt werden. Aufgrund des fortgeschrittenen Multiorganversagens und mangels weiterer Therapieoptionen wurde die intensivmedizinische Therapie am 10.03.03 eingestellt.

Patient 28:

Der 47 jährige Patient erhielt 1999 bei einer Leberzirrhose unklarer Genese eine Lebertransplantation. Die Immunsuppression wurde mit Sandimmun (Zielspiegel 80 – 100 ng/ml) und Hydrocortison 200 mg/ d i.v. durchgeführt. Am 08.01.03 wurde ein Empyem der re. Hüfte diagnostiziert, und am 09.01.03 die Hüftkopfresektion vorgenommen. Im Rachenabstrich fand sich ab 13.01.03 mehrfach *C.albicans* , im TS am 23.01.03 *C.albicans* und *C.krusei*. Auch in der Blutkultur vom 09.02.03 sowie in der BAL vom 13.02.03 konnte *C.albicans* isoliert werden . In Analabstrichen fanden sich ab dem 27.01.03 *Candida albicans* und *krusei*. Antimykotisch therapiert wurde vom 11.02.03 – 24.02.03 mit Voriconazol, vom 19.02. – 11.3.03 mit Fluconazol und ab dem 11.03.03 bis zur Verlegung mit Voriconazol. Aufgrund des Nachweise

von MRSA in Nase, Rachen, TS, BAL und Analabstrichen wurde auch antimikrobiell therapiert.

Die Zuordnung der Proben zu den Patienten zeigt Tabelle 11.

Tabelle 11: Zuordnung der Patienten zu den Proben:

Patientennummer	Probennummer
1	1,2
2	3,4,5,13
3	6,9,14,15
4	7,11,12,16,17,21
5	8,10,19,20,24,25,26,35,45,46
6	22,23,27,53,65,74,76
7	44,57,58,59,66,73
8	108,109,116,117,18,119
9	29
10	30,33,34
11	31,49
12	50
13	51
14	52,56
15	54
16	62
17	63
18	64
19	70,71
20	78,79,81,87,88,91
21	82
22	83
23	84
24	85,86
25	89
26	90
27	92,93
28	94,97,102,105,106
29	95,96,98,99,100,101,103,113,114
30	104
31	107,111,112,120,121,122

Außer diesen Patientenproben wurden auch Blutproben gesunder Probanden untersucht, die vorher mit DNA der verschiedenen Candida – Spezies beimpft wurden. Die dafür verwandten Kulturen stammen vom Mikrobiologischen Institut der Universität Tübingen.

3. Ergebnisse

3.1 Exemplarische Darstellung der Untersuchungsmethoden

3.1.1 Gelelektrophorese

Abbildung 3 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Gelelektrophorese folgender Proben:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
100	35	34	32	116	81	80	47	40	37	45	49	65
bp												
Marke												
r												
	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
14	15	16	17	18	19	20	21					

100 bp Marke r	66	69	73	95	97	103	Neg. Kontrolle
	+	-	+	+	+	+	-

+ = positives Ergebnis

- = negatives Ergebnis

Abgelesen wird das Ergebnis bei 500bp. Die Intensität des fluoreszierenden Farbstoffes korreliert mit der DNA – Menge.

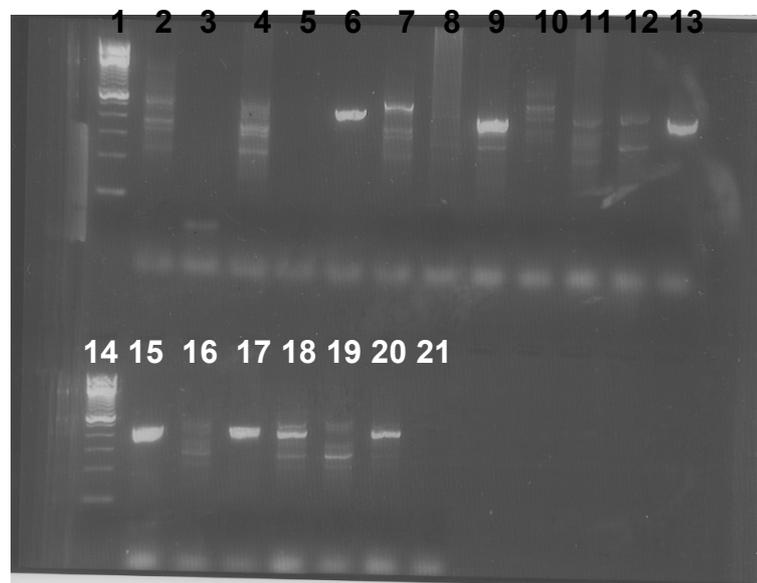


Abbildung 3

3.1.2 LightCycler™

Der LightCycler™ dokumentiert das Ergebnis in einer Graphik, die den Fluoreszenzanstieg während der Zyklen darstellt. Außerdem wird für jede Probe die errechnete DNA Menge angegeben.

Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Graphik eines solchen LightCycler™ Laufes.

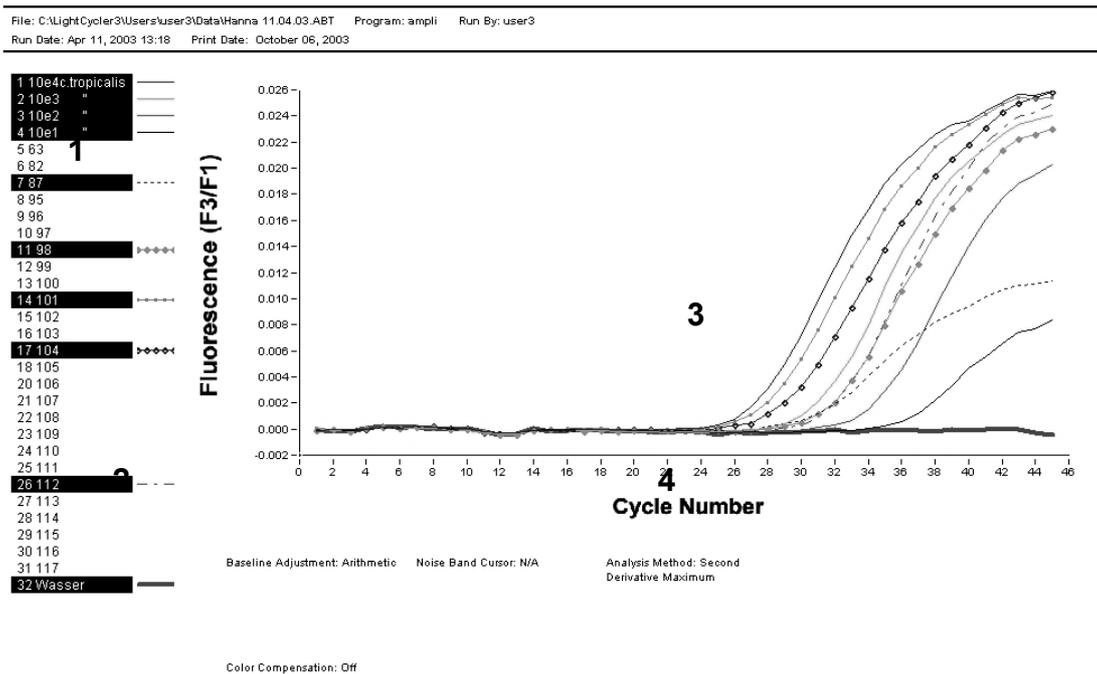


Abbildung 4

3.1.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung liefert die Basenabfolge des ermittelten Erregers und stellt diese graphisch dar. Ein Beispiel zeigt Abbildung 5. Die Ermittlung des Pathogens erfolgt durch Vergleich der Sequenz mit einer Datenbank (71) innerhalb weniger Minuten. Es erfolgt eine Angabe aller in Frage kommenden Organismen mit genauem Vergleich der übereinstimmenden Basenpaare. Abbildung 5 zeigt die Darstellung der Basenfolge einer Probe die *Candida tropicalis* enthielt (Probennummer 2 aus 3.5.5).

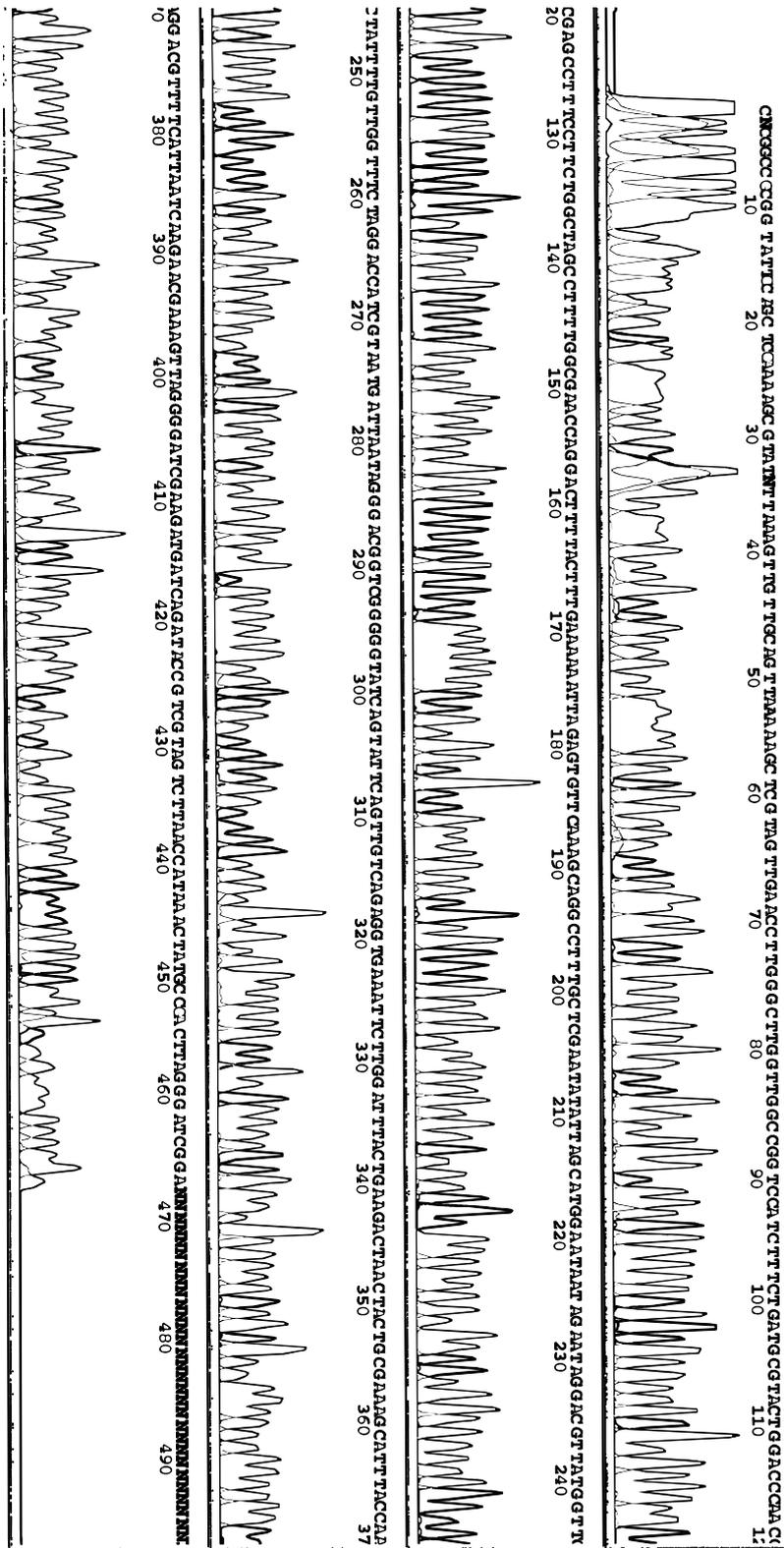


Abbildung 5

3.1.4 Sensitivität des LightCycler™ unter Einsatz der Common

Candida Sonde

Bevor mit der Untersuchung der Patientenproben begonnen werden konnte, wurden für *Candida albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae*, *C.parapsilosis* und *C.krusei* Standards für die LightCycler™PCR ermittelt. Als Sonde diente die unter 2.1.3.1 beschriebene Common Candida Sonde. Die absolute Nachweisgrenze für *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* *Candida krusei* lag bei 10^1 /ml (entspricht 100fg Pilz – DNA). *Candida lusitaniae* konnte bis zu einer Konzentration von 800 fg Pilz – DNA , *Candida parapsilosis* bis zu einer Konzentration von 200 fg Pilz – DNA detektiert werden. Die bei allen Untersuchungen mitgeführten Negativkontrollen verblieben negativ.

Für die Untersuchungen der Patientenproben wurde im Folgenden die Verdünnungsreihe von *Candida tropicalis* als Standard verwendet.

3.1.5 Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse mit dem LightCycler™

Da universelle Pilzprimer verwendet worden sind, ist es von Interesse festzustellen, ob unterschiedliche Pilze amplifiziert worden sind. Durch die Schmelzkurvenanalyse kann dargestellt werden, bei welcher Temperatur die Sonden wieder vom Amplifikat abschmelzen. Sonden, die nicht zu 100% zum amplifizierten Pilz passen, schmelzen schon bei niedrigeren Temperaturen wieder ab. Pro Base die nicht der erwarteten Basenabfolge entspricht, verringert sich die Abschmelztemperatur um 3 – 5 °C. So wird eine Unterscheidung unterschiedlicher Spezies möglich. Bei der Schmelzkurvenanalyse der untersuchten Proben zeigte sich, dass sich die Abschmelztemperaturen nicht unterscheiden. Es kann also nicht zwischen den verschiedenen *Candida* spp unterschieden werden.

Abbildung 6 zeigt exemplarisch die Schmelzkurvenanalyse eines Laufes.

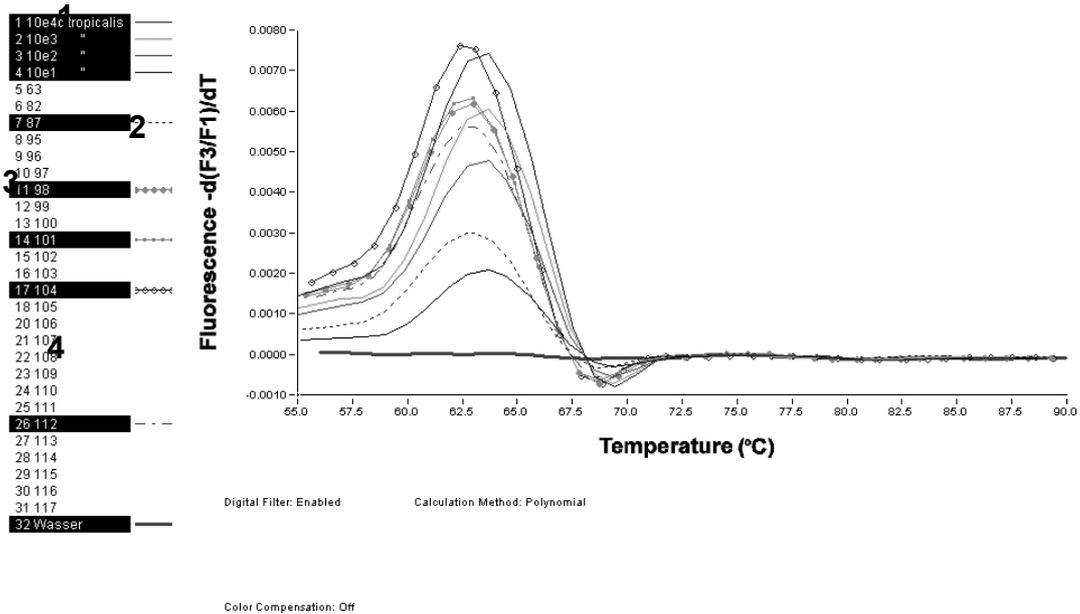


Abbildung 6

3.1.6 Ergebnisermittlung mittels PCR – ELISA

Ob eine Probe in der PCR – ELISA als positiv gewertet wird, ergibt sich aus der Berechnung des cut-off Wertes. Eine Probe ist folglich positiv, wenn ihr ermitteltes Ergebnis über diesem Wert liegt. Der cut-off Wert errechnet sich aus dem dreifachen OD Wert des Durchschnittes aller Negativkontrollen und wird für jeden Lauf einzeln ermittelt.

3.2 Darstellung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Materialien

Insgesamt wurden 94 Proben von 31 Patienten zwischen September 2002 und März 2003 untersucht. Diese Proben teilen sich auf in 38 Proben aus dem oberen Respirationstrakt, 18 Proben aus dem Bauchraum, 25 Vollblutproben und 13 Katheterurinproben.

Alle Proben wurden nach der Extraktion (siehe unter 2.1.1) zunächst mittels PCR – ELISA (siehe unter 2.1.2) untersucht. Außerdem wurde das PCR Produkt in den LightCycler™ eingesetzt (2.1.3). Nach einer neuen PCR wurde von allen Proben eine Gelelektrophorese angefertigt. Nun wurden alle Proben, die wenigstens bei einer der anderen Methoden ein positives Ergebnis zeigten, der Sequenzierung unterzogen.

Außerdem wurde bei alle Proben im Mikrobiologischen Institut der Universität Tübingen eine kulturelle Diagnostik durchgeführt.

Zusätzlich zu den 25 Vollblutproben wurden 6 Vollblutproben eines gesunden Probanden mit klinisch relevanten *Candida* spp versetzt und mittels Gelelektrophorese, LightCycler™ und Sequenzierung untersucht.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt zunächst durch einen Überblick über die unterschiedlichen Materialien.

3.2.1 Proben aus dem oberen Respirationstrakt

Die Proben aus dem oberen Respirationstrakt teilen sich auf in 2 Sputum – Proben, 35 Trachealsekretproben und einen Rachenabstrich, Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

Tabelle 12: Ergebnisse der Proben aus dem oberen Respirationstrakt:

Proben- Nummer	Datum Abnahme	PCR- ELISA	Light- Cycler™	Gelelektro - phorese	Sequenzie - rung	Mikro- biologie
6	23.09.02	11.5	+	+	C.alb.	C.alb.
7	23.09.02	9.8	-	+	C.alb.	C.alb.
8	23.09.02	2.8	+	+	C.alb.	-
9	26.09.02	8.3	+	+	C.alb.	C.alb.
11	26.09.02	6.6	+	+	C.alb.	C.alb.
26	17.10.02	7.2	+	+	C.krusei	C.krusei
27	17.10.02	6.8	+	+	C.glabr.	C.glabr.
28	17.10.02	7.7	+	+	C.glabr.	C.glabr.
29	17.10.02	7.6	+	+	C.alb.	C.alb.
31	24.10.02	10.5	+	+	C.alb.	-
34	24.10.02	2.7	-	+	n.s.	- (Bakt.)
35	24.10.02	1.9	-	+	n.s.	C.alb.
45	31.10.02	8.3	-	+	n.s.	- (Bakt.)
49	31.10.03	4.2	+	+	n.s.	C.alb.,C.gla.
50	26.11.02	>10	+	+	C.alb.	C.alb.
52	26.11.02	>10	+	+	C.alb.	C.alb.
53	26.11.03	2.3	+	+	C.glabr.	C.glabr.
56	28.11.02	>10	+	+	C.alb.	C.alb.
63	12.12.02	2.6	-	-	n.s.	-
82	15.01.03	1.8	+	+	C.alb.	-
83	15.01.03	7.9	+	+	C.trop.	C.trop.
86	23.01.03	>10	+	+	C.alb.	C.alb.
87	23.01.03	9.4	+	+	C.glabr.	C.glabr.
89	29.01.03	8.8	+	+	C.alb.	C.alb.
90	29.01.03	8.2	+	+	C.trop.	C.trop.
91	29.01.03	7.9	+	+	C.glabr.	C.glabr.
92	13.02.03	>10	+	+	C.alb.	C.alb.
14	02.10.02	>10	+	+	n.s.	C.alb.,C.gla.
16	02.10.02	>10	+	+	C.alb.	C.alb.,
21	11.10.02	8.8	+	+	C.alb.	C.alb.
94	13.02.03	1.3	+	+	C.alb.	- (Bakt.)
51	26.11.20	-	-	-	entf.	-
54	26.11.02	-	-	-	entf.	-
58	28.11.02	-	+	+	C.glabr.	C.glabr.
62	12.12.02	-	-	-	entf.	-
64	12.12.02	-	-	-	entf.	-
85	15.01.03	-	+	+	C.alb.	C.alb.
84	15.01.03	-	-	-	entf.	-

- = negativ

+ = positiv

n.s. = nicht sequenzierbar

entf. = entfällt

Bei 25 von 38 Proben stimmen alle Methoden hinsichtlich eines positiven oder negativen Ergebnisses überein. Von diesen 25 Proben sind demnach 20 Proben positiv, wobei in 12 Fällen *Candida albicans*, in 5 Fällen *Candida glabrata*, in 2 Fällen *Candida tropicalis* und in einem Fall *Candida krusei* nachgewiesen wurde. Weitere 5 Proben wurden übereinstimmend negativ bewertet.

Wenn man nun die Ergebnisse der Mikrobiologischen Untersuchung mit der Sequenzierung vergleicht, stellt man eine Übereinstimmung bei 31 von 38 Proben fest. In 2 Fällen konnte nicht sequenziert werden, da sich laut kulturellem Befund sowohl *Candida albicans* als auch *Candida glabrata* in der Probe befanden.

Einmal konnte nicht sequenziert werden, obwohl PCR – ELISA (schwach), Gelelektrophorese und Kultur einen positiven Befund nahe legten. Allerdings war hier auch kein Nachweis mit dem LightCycler™ möglich.

Die Mikrobiologische Untersuchung blieb in 4 Fällen negativ, obwohl alle anderen Untersuchungen positiv ausfielen.

Beim Vergleich von LightCycler™ und Kultur fällt auf, dass die Kultur 4 mal negativ bleibt, obwohl alle anderen Ergebnisse für einen positiven Befund sprechen. Dagegen hat die LightCycler™ - Methode nur 2 mal Schwierigkeiten, wobei in einem Fall auch keine Sequenzierung möglich war.

Die Untersuchung mittels PCR – ELISA ergab im Vergleich mit der Kultur 3 Mal einen negativen Befund, der von allen anderen Methoden widerlegt wurde. Bei der Kultur war dies 6 Mal der Fall, wobei bei 2 dieser Proben nur die Gelelektrophorese das positive Ergebnis der PCR – ELISA nachvollziehen konnte.

Betrachtet man die Ergebnisse der Gelelektrophorese, stellt man fest, dass sie in 2 Fällen in Übereinstimmung mit der PCR – ELISA Methode ein positives Ergebnis lieferte, obwohl die anderen Methoden für einen negativen Befund sprachen.

In Tabelle 13 folgt eine Darstellung der Anzahl der negativen Ergebnisse, bei denen die jeweils anderen Untersuchungen für einen positiven Befund sprechen, sowie in Tabelle 14 die Anzahl der positiven Ergebnisse, obwohl die anderen Untersuchungen für einen negativen Befund sprechen.

Tabelle 13: Anzahl der negativen Ergebnisse, obwohl die anderen Untersuchungen für einen positiven Befund sprechen:

PCR – ELISA	2
LightCycler™	2
Gelelektrophorese	0
Sequenzierung	3
Mikrobiologische Untersuchung	4

Tabelle 14: Anzahl der positiven Ergebnisse, obwohl die anderen Untersuchungen für einen negativen Befund sprechen:

PCR – ELISA	3
LightCycler™	0
Gelelektrophorese	2 (PCR – ELISA ebenfalls positiv)
Sequenzierung	0
Mikrobiologische Untersuchung	0

3.2.2 Proben aus dem Bauchraum

Bei den Proben aus dem Bauchraum handelt es sich 12 Mal um abdominelles Drainagematerial, ein Mal um Aszites und in 5 Fällen um intraabdominelle Abstriche. Einen Überblick über die Ergebnisse zeigt Tabelle 15.

Tabelle 15: Ergebnisse der Proben aus dem Bauchraum

Probennummer	Datum Abnahme	PCR-ELISA	Light-Cycler™	Gelelektrophorese	Sequenzierung	Mikrobiologie
1	05.09.02	4.4	-	-	n.s.	-
44	01.11.02	11.5	+	+	C.glabr.	C.glabr.
65	12.12.02	10	+	+	C.glabr.	C.glabr.
66	12.12.02	>10	+	+	C.glabr.	C.glabr.
73	17.12.02	>10	+	+	C.glabr.	C.glabr.
95	15.02.03	0.9	+	+	C.alb.	C.alb.
98	17.02.03	3.0	+	+	C.alb.	C.alb.
101	24.02.03	3.6	+	+	C.alb.	C.alb.
103	02.03.03	4.1	+	+	n.s.	C.alb.
116	20.03.03	2.9	-	-	n.s.	- (Bakt.)
59	28.11.02	1.7	+	+	C.glabr.	- (Bakt.)
22	11.10.02	-	-	-	entf.	-
33	24.10.02	-	-	-	entf.	-
71	17.12.02	-	-	-	entf.	- (Bakt.)
105	02.03.03	-	-	-	entf.	-
108	18.03.03	-	-	-	entf.	-
113	18.03.03	-	-	-	entf.	-
120	21.03.03	-	-	-	entf.	-

In 14 von 18 Fällen stimmen alle Methoden hinsichtlich eines positiven oder negativen Ergebnisses überein. Dabei wurden 7 Proben übereinstimmend positiv und 7 Proben übereinstimmend negativ bewertet. Von den 7 positiven Proben entfallen 3 auf *Candida albicans* und 4 auf *Candida glabrata*.

Beim Vergleich von Sequenzierung und Kultur findet sich eine Übereinstimmung bei 16 der 18 Proben. Sowohl die Mikrobiologische Untersuchung als auch die Sequenzierung konnten in einem Fall die Ergebnisse der anderen Methoden nicht nachvollziehen.

LightCycler™ und Kultur ergaben bis auf einen Fall gleiche Ergebnisse, hier blieb die Kultur als einzige Methode negativ.

Wenn man die Ergebnisse von Kultur und PCR – ELISA vergleicht, fällt auf, dass die Kultur in einem Fall im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen negativ bleibt. Die PCR – ELISA ergibt jedoch in 2 Fällen positive Ergebnisse, obwohl alle anderen Methoden einen positiven Befund nahe legen.

Auch im Vergleich mit der Gelelektrophorese bleibt die Kultur in einem Fall als einzige Methode negativ.

In Tabelle 16 folgt wiederum eine Darstellung der Anzahl der negativen Ergebnisse, bei denen die jeweils anderen Untersuchungen für einen positiven Befund sprechen, sowie in Tabelle 17 die Anzahl der positiven Ergebnisse, obwohl die anderen Untersuchungen für einen negativen Befund sprechen.

Tabelle 16: Anzahl der negativen Ergebnisse, obwohl die anderen Untersuchungen für einen positiven Befund sprechen:

PCR – ELISA	0
LightCycler™	0
Gelelektrophorese	0
Sequenzierung	1
Mikrobiologische Untersuchung	1

Tabelle 17: Anzahl der positiven Ergebnisse, obwohl die anderen Untersuchungen für einen negativen Befund sprechen:

PCR – ELISA	2
LightCycler™	0
Gelelektrophorese	0
Sequenzierung	0
Mikrobiologische Untersuchung	0

3.2.3 Katheterurinproben

Tabelle 18 verschafft einen Überblick über die Ergebnisse der 13 Katheterurinproben.

Tabelle 18: Ergebnisse der Katheterurinproben:

Probennummer	Datum Abnahme	PCR-ELISA	Light-cycler™	Gelelektrophorese	Sequenzierung	Mikrobiologie
3	05.09.02	11.5	+	+	C.alb.	C.alb.
5	23.09.02	4.5	+	+	C.alb.	C.alb.

12	26.09.02	7.6	-	-	-	-
13	26.09.02	8.2	-	+	C.alb.	C.alb.
79	10.01.03	8.5	+	+	C.glabr.	-
81	14.01.03	>10	+	+	C.glabr.	-
104	24.02.03	6.4	+	+	C.glabr.	-
112	19.03.03	1.6	+	+	C.alb.	C.alb.
122	21.03.02	4.4	+	+	C.alb.	C.alb.
15	02.10.02	-	-	-	entf.	-
17	02.10.02	-	-	-	entf.	-
20	02.10.03	-	-	-	entf.	-
118	20.03.03	-	-	-	entf.	-

Eine komplette Übereinstimmung hinsichtlich eines positiven oder negativen Ergebnisses fand sich bei 8 von 13 Proben. In 4 Fällen ergaben alle Methoden ein positives Ergebnis, jedesmal konnte *Candida albicans* nachgewiesen werden. Vier mal wurde übereinstimmend ein negatives Ergebnis erzielt.

Vergleicht man nun Kultur und Sequenzierung, stimmen 10 von 13 Proben überein. Bei 3 Proben ergab die Kultur ein negatives Ergebnis, obwohl alle anderen Methoden einen positiven Befund nahe legen. Zwei dieser Proben stammen von einem Patienten, bei dem sowohl vorher als auch hinterher *Candida glabrata* im Urin bei der Mikrobiologischen Untersuchung nachgewiesen wurde.

Beim Vergleich LightCycler™ vs Kultur findet man 4 Fälle bei denen die Kultur negativ bleibt, sowie einen Fall in dem die Sequenzierung das positive Ergebnis der anderen Methoden nicht nachvollziehen kann.

Im Vergleich von PCR – ELISA und Mikrobiologischer Untersuchung fallen 4 Proben auf, bei denen die Mikrobiologische Untersuchung negativ bleibt, Allerdings widerspricht die PCR – ELISA in einem Fall dem negativen Ergebnis aller anderen Methoden.

Auch beim Vergleich der Kultur mit der Gelelektrophorese fallen die 3 Proben auf, bei denen die Kultur als einzige negativ bleibt.

In Tabelle 19 folgt wie bei den anderen Materialien die Darstellung der Anzahl der negativen Ergebnisse, bei denen die jeweils anderen Untersuchungen für einen positiven Befund sprechen, sowie in Tabelle 20 die Anzahl der positiven Ergebnisse, obwohl die anderen Untersuchungen für einen negativen Befund sprechen.

Tabelle 19: Anzahl der negativen Ergebnisse, obwohl die anderen Untersuchungen für einen positiven Befund sprechen:

PCR – ELISA	0
LightCycler™	1
Gelelektrophorese	0
Sequenzierung	0
Mikrobiologische Untersuchung	3

Tabelle 20: Anzahl der positiven Ergebnisse, obwohl die anderen Untersuchungen für einen negativen Befund sprechen:

PCR – ELISA	1
LightCycler™	0
Gelelektrophorese	0
Sequenzierung	0
Mikrobiologische Untersuchung	0

3.2.4 Vollblutproben

Untersucht wurden insgesamt 25 Vollblutproben von Patienten, einen Überblick über die Ergebnisse gibt Tabelle 21.

Tabelle 21: Ergebnisse der Vollblutproben der Patienten

Probennummer	Datum Abnahme	PCR-ELISA	Light-Cycler™	Gelelektrophorese	Sequenzierung	Mikrobiologie
2	05.09.02	-	-	-	entf.	-
4	23.09.02	-	-	-	entf.	-
10	26.09.02	-	-	-	entf.	- (Bakt.)
19	02.10.02	-	-	-	entf.	-
23	11.10.02	-	-	-	entf.	- (Bakt.)

24	11.10.02	-	-	-	entf.	-
25	17.10.02	-	-	-	entf.	-
30	24.10.02	-	-	-	entf.	-
46	24.10.02	-	-	-	entf.	-
57	28.11.02	-	-	-	entf.	-
74	17.12.02	-	-	-	entf.	-
76	31.12.02	-	-	-	entf.	-
78	10.01.03	-	-	-	entf.	-
96	15.02.03	-	-	-	entf.	-
97	15.02.03	-	-	-	entf.	-
99	17.02.03	-	-	-	entf.	-
100	24.02.03	-	-	-	entf.	-
106	02.03.03	-	-	-	entf.	- (Bakt.)
107	12.03.03	-	-	-	entf.	-
109	18.03.03	-	-	-	entf.	-
111	18.03.03	-	-	-	entf.	-
114	18.03.03	-	-	-	entf.	-
117	20.03.03	-	-	-	entf.	-
119	20.03.03	-	-	-	entf.	- (Bakt.)
121	21.03.03	-	-	-	entf.	-

Die Vollblutproben blieben bei allen Methoden übereinstimmend negativ, so dass 6 Vollblutproben eines gesunden Probanden mit *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* und *Candida parapsilosis* versetzt wurden.

3.2.5 Beimpfte Vollblutproben

Diese Proben wurden ebenfalls mittels LightCycler™, Gelelektrophorese und Sequenzierung untersucht, wobei die Pilze mit allen verwandten Methoden nachgewiesen werden konnten.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Ergebnisse der beimpften Vollblutproben

Probennummer	Gelelektrophorese	Light-Cycler™	Sequenzierung	Beimpft mit
1	+	+	<i>C.lusitaniae</i>	<i>C.lusitaniae</i>
2	+	+	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.tropicalis</i>
3	+	+	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>

4	+	+	C.glabrata	C.glabrata
5	+	+	C.krusei	C.krusei
6	+	+	C.parapsilosis	C.parapsilosis

3.3 Verteilung der verschiedenen Candida spp auf die Proben

Um Die Verteilung der unterschiedlichen Candida spp zu betrachten, sollen die Ergebnisse der Sequenzierung im Vergleich mit denen der Mikrobiologischen Untersuchung herangezogen werden. In Tabelle 23 werden die Ergebnisse gegenübergestellt.

Tabelle 23: Verteilung der Candida spp bei Sequenzierung und Kultur

Material	Sequenzierung	Kultur
----------	---------------	--------

Proben aus dem oberen Respirationstrakt	18x C.albicans 5x C.glabrata 2x C.tropicalis 1x C.krusei	16x C.albicans 5x bzw.7x C.glabrata 2x C.tropicalis 1x C.krusei
Proben aus dem Bauchraum	3x C.albicans 5x C.glabrata	4x C.albicans 4x C.glabrata
Katheterurinproben	5x C.albicans 3x C.glabrata	5x C.albicans
Gesamtes Probenmaterial	26x C.albicans 13x C.glabrata 2x C,tropicalis 1x C.krusei	25x C.albicans 9x C.glabrata 2x C,tropicalis 1x C.krusei

Die auffallenden Unterschiede sind dadurch zu begründen, dass die Sequenzierung öfter ein positives Ergebnis lieferte als die Kultur. Die Kultur ergab in 37 Fällen ein positives Ergebnis, die Sequenzierung jedoch in 43 Fällen. Entscheidend ist, dass bei keiner der Proben unterschiedliche Candida spp ermittelt wurden. Die Unterschiede bestehen immer hinsichtlich Positivität oder Negativität der Proben.

3.4 *Arbeitsaufwand und Kosten im Vergleich*

Für die Beurteilung der einzelnen Methoden interessiert nicht nur die Zeitspanne bis zum Erhalt des Ergebnisses, sondern auch Faktoren wie der reine Arbeitsaufwand, die Laufzeit der Geräte sowie die entstehenden Kosten. In Tabelle 26 werden die Verfahren hinsichtlich dieser Kriterien verglichen.

Tabelle 26: Arbeitsaufwand und Kosten im Vergleich

Verfahren	Gesamter Zeitbedarf	reine Arbeitszeit	Gerätelaufzeit, Wartezeit	Kosten pro Probe (Euro)
-----------	------------------------	----------------------	------------------------------	----------------------------

manuelle Extraktion	3h 30 min	1h 40 min	1h 30 min	3.50
PCR	3h 45 min	15 min	3h 30 min	7.00
ELISA	4h 30 min	1h	3h 30 min	1.50
LightCycler™	1h 30 min	30 min	1h	2.20
Gelelektrophorese	1h 45 min	45 min	1h	0.20
Sequenzierung				7.00
Kultur vorläufig. endgültig. Befund	24h 7d	30 min	23h 30 min 7d	1 – 6 Euro je nach Material

Die Angaben über die Kosten pro Probe beinhalten nur die Materialkosten pro Probe, nicht die sehr unterschiedlichen Anschaffungskosten für die Geräte.

Zu beachten ist außerdem, dass die Extraktion die Voraussetzung für alle Methoden außer der Kultur darstellt.

Wird die Extraktion manuell durchgeführt, ergibt sich für die PCR – ELISA Methode ein Zeitbedarf von 1.5 Arbeitstagen, da die PCR über Nacht durchgeführt werden kann.

Das LightCycler Ergebnis stünde dagegen am Ende eines Arbeitstages zu Verfügung, das der Gelelektrophorese ebenfalls.

Das Sequenzierungsergebnis würde am Morgen des dritten Arbeitstages vorliegen.

Der vorläufige Befund der Kultur liegt zwar schon nach 24 Stunden vor, jedoch schließt ein vorläufig negatives Ergebnis ein späteres Wachstum nicht sicher aus, ca. 10% der erst negativen Proben werden nach Abschluss der Untersuchungen noch positiv.

4. Diskussion

Die Fortschritte welche die Medizin in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Onkologie und der Intensivmedizin gemacht hat, bringen zunehmend Probleme bei der Bekämpfung invasiver Infektionen mit sich.

Agressivere Therapien bei der Tumorbekämpfung insbesondere in der Hämatologie , aber auch der steigende Bedarf antimikrobieller Substanzen in der Intensivmedizin führen zur Immunsuppression der Patienten und prädisponieren zu invasiven Infektionen (58).

Das Risiko einer invasiven Mykose steigt mit zunehmender Neutropeniedauer (54,56) und ist besonders hoch bei Patienten mit therapiebedingter

Immunsuppression, invasiven Therapien, Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus oder Zystischer Fibrose. Auch Verbrennungsoffer, Frühgeborene und alte Patienten gehören zum Risikokollektiv.

Das Risiko einer systemischen Candidose hat in den letzten 20 Jahren ständig zugenommen (48,4,58,5), ursächlich ist insbesondere die Immunsuppression nach Knochenmarktransplantation beziehungsweise allogener Stammzelltransplantation oder unter einer Chemotherapie (44,51).

Entscheidender Faktor für die Prognose des Patienten ist der Zeitpunkt der Therapieinitiierung (1,52).

Am Beispiel von Cytomegalie - Virus Infektionen konnte bereits gezeigt werden, dass die Mortalität deutlich gesenkt werden kann wenn als Basis für die Frühintervention molekularbiologische Nachweisverfahren verwendet werden (17,16).

Eine Prophylaxe mit Antimykotika ist zwar durchführbar und wird oftmals auch praktiziert, ist jedoch aufgrund der nicht unerheblichen Nebenwirkungen (9) insbesondere von Amphotericin B sorgfältig abzuwägen.

Auch die zunehmende Resistenzentwicklung zum Beispiel von *Candida albicans* (41,44,73) gegen Fluconazol sprechen gegen einen großzügigen Einsatz von Antimykotika zur Prophylaxe.

Es ist also erstrebenswert diese Risiken durch verbessertes Screening und Frühdiagnostik zu minimieren.

Da das klinische Bild in diesen Fällen höchstens hinweisgebend ist (66) basiert die Diagnose immer auf mikrobiologischen oder molekularbiologischen Detektionsverfahren. Insbesondere Risikopatienten könnten von engmaschigen Kontrollen mit schnellen und zuverlässigen Verfahren profitieren. Prophylaktische Gaben wie zum Beispiel von Fluconazol über 1 – 3 Monate nach Lebertransplantation (66) würden entfallen.

Auch die Tatsache dass sich das typische Erregerspektrum bei systemischen Mykosen in den letzten Jahren gewandelt hat, erschwert die prophylaktische und kalkulierte antimykotische Therapie zusätzlich. Je früher der genaue Erreger feststeht, desto sicherer und nebenwirkungsärmer kann therapiert

werden. Früher handelte es sich vor allem um *Candida albicans* Infektionen, aber in den letzten Jahren treten immer mehr non – *albicans* Infektionen auf . So ist *Candida krusei* für bis zu 10 % der *Candida* – Infektionen nach allogener Stammzelltransplantationen verantwortlich (73). Insbesondere beim Auftreten einer Graft vs Host Reaktion unter Kortikoidtherapie besteht zusätzlich die Gefahr invasiver Mykosen.

Das Routineverfahren zur Diagnose von Pilzinfektionen stellt nach wie vor die Mikrobiologische Untersuchung durch Anlegen einer Kultur dar.

Da heute noch immer die meisten Pilzinfektionen erst post mortem nachgewiesen werden (7,27,63), ist es notwendig, nach sensitiveren Nachweismethoden zu suchen.

In den letzten Jahren wurden molekularbiologische Verfahren etabliert, für die jedoch nur individuelle Protokolle existieren, die keine Standardisierung aufweisen. Es handelt sich hierbei um individuelle Protokolle für Konventionelle PCR (9,11,12,18,19,20,21,22,23) sowie für die real – time PCR mit dem LightCycler™ (48) oder dem Taq Man (8,28). Extraktionsautomaten wie das Magna PureLC System ermöglichen in Kombination mit Real – time PCR Geräten die Durchführung von Extraktion, Amplifikation und Detektion innerhalb eines Arbeitstages (46).

Ein Vorteil der molekularbiologischen Verfahren liegt in der höheren Sensitivität. Auch bei sehr geringer Pilzlast wie zum Beispiel im Blut sind die Pathogene teilweise bis zu einer Pilzlast von 10^2 CFU /ml (46) nachweisbar.

Ziel dieser Arbeit war es, die zur Verfügung stehenden Methoden zum Pilznachweis in klinisch relevanten Materialien mit der Routinediagnostik, der Mikrobiologischen Untersuchung mittels Anlegen einer Kultur, zu vergleichen. Untersucht wurden insgesamt 94 Proben von 31 intensivmedizinisch betreuten Patienten mit sehr unterschiedlichen Grunderkrankungen und Risikofaktoren. Unter immunsuppressiver Therapie standen nur 2 Patienten (Nummer 28,19), die eine Lebertransplantation beziehungsweise eine kombinierte Nieren – und Pankreas – Transplantation erhalten hatten . Bei den Grunderkrankungen der Patienten handelt es sich um Chronisch

Entzündliche Darmerkrankungen, Polytraumata durch Verkehrsunfälle, Erkrankungen des Herz – Kreislaufsystems sowie Komplikationen nach Gastrointestinalen oder Hirnchirurgischen Eingriffen. Die Patienten waren zwischen 18 und 80 Jahren alt, das Durchschnittsalter betrug 61 Jahre. Sieben Patienten standen zum Zeitpunkt der Probeentnahme unter antimykotischer Therapie, vier Patienten verstarben im Rahmen septischer Komplikationen.

Da die Entscheidung zu einer antimykotischen Therapie aufgrund der schwer zu beurteilenden Klinik mit Hilfe eines Erregernachweises möglichst im Blut gestellt werden sollte, muss nach sensitiveren Methoden gesucht werden. Der Nachweis von Pilz – DNA im Blut ist auch bei Invasivität einer Pilzinfektion durch die Blutkultur nicht immer gewährleistet, die Unterscheidung zwischen Kolonisation und Invasion schwierig.

Aus diesem Grund werden viele Patienten, die klinische Kennzeichen einer Infektion zeigen und nicht auf eine antimikrobielle Therapie ansprechen, antimykotisch behandelt. Dies war auch bei einigen Patienten, von denen die Proben für die vorliegenden Untersuchungen gewonnen wurden, der Fall. Oft waren *Candida* in Trachealsekret, abdominellem Sekret oder Urin nachweisbar ohne dass die Invasivität durch positive Blutkulturen zu belegen war. Sie wurden daraufhin antimykotisch therapiert, was einen anschließenden Nachweis im Blut zusätzlich erschwert.

Die Beurteilung positiver Befunde in Trachealsekret, abdominellem Sekret oder Katheterurin ist auch in Kombination mit der Klinik schwierig. Je mehr Risikofaktoren für invasive Mykosen hinzukommen, desto wahrscheinlicher wird eine Invasion.

Eine der Patientinnen erkrankte mit positiven Blutkulturen an einer Invasiven Candidose durch *Candida albicans*. Nach abgeschlossener antimykotischer Therapie waren die Blutkulturen wieder negativ, aber es kam mit einer Latenz von mehreren Monaten zu einer Spondylodiszitis der LWK 3/4. Durch eine Probeentnahme konnte *Candida albicans* nachgewiesen werden.

Alle Patientenproben wurden nach der manuellen Extraktion zunächst in einen PCR – ELISA eingesetzt, und die extrahierte DNA mittels LightCycler™ untersucht. Danach wurde nach einer weiteren PCR eine Gelelektrophorese angefertigt und das restliche Material mittels Sequenzierung untersucht. Parallel zu diesen Untersuchungen gingen Proben derselben Materialien innerhalb der Routinekontrolle an das Mikrobiologische Institut der Universität Tübingen und wurde dort durch Anlegen von Kulturen mikrobiologisch untersucht.

Außerdem wurden Vollblutproben eines gesunden Probanden mit *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae* und *Candida parapsilosis* versetzt und ebenfalls mittels Gelelektrophorese, LightCycler und Sequenzierung untersucht.

Die PCR – ELISA Methode liegt mit 12 Euro pro Probe im oberen Bereich. Kostspieliger ist nur die Sequenzierung mit 17.50 EURO pro Probe. Auch der Zeitaufwand von circa 11 Stunden und 45 Minuten wird nur von der Sequenzierung überschritten, deren Resultat am Morgen des dritten Tages vorliegt.

Der Nachweis erfolgt wie beim LightCycler™ nur gattungsspezifisch.

Bei der Untersuchung der Patientenproben lieferte diese Methode in jeweils vier Fällen ein positives beziehungsweise negatives Ergebnis, dem alle anderen Methoden widersprachen.

Um Erreger mit Hilfe der Gelelektrophorese nachzuweisen, muss zunächst eine konventionelle PCR durchgeführt werden, nachdem die DNA extrahiert worden ist. Der Zeitbedarf für alle Arbeitsschritte liegt insgesamt bei circa neun Stunden. Mit den anfallenden Materialkosten von 10.70 Euro pro Probe ist diese Methode ebenso teuer wie PCR – ELISA, teurer als das Verfahren mit dem LightCycler, aber billiger als die Sequenzierung.

Da mit der Gelelektrophorese nur ein genereller Pilznachweis erbracht werden kann, wäre eine Kombination mit der Sequenzierung durchaus sinnvoll. Bei den vorliegenden Untersuchungen war die Gelelektrophorese immer in der

Lage die übereinstimmend positiven Ergebnisse der anderen Methoden nachzuvollziehen. Man könnte also immer zunächst eine Gelelektrophorese an die PCR anschließen, um festzustellen ob das untersuchte Material Pilz – DNA enthält. Im Falle eines positiven Ergebnisses könnte die Speziesdifferenzierung durch eine anschließende Sequenzierung geleistet werden. Dieses Vorgehen würde einerseits die Therapieentscheidung erleichtern und andererseits im Falle eines negativen Ergebnisses die Kosten für die Sequenzierung einsparen.

In zwei Fällen lieferte die Gelelektrophorese positive Befunde, obwohl die anderen Methoden einen negativen Befund nahe legten. Allerdings lieferte hier die PCR – ELISA Methode ebenfalls ein positives Ergebnis.

Aufgrund der geringen Spezifität der Gelelektrophorese ist das Risiko zur Erfassung von Kontaminationen besonders hoch, es werden leicht auch nicht humanpathogene Pilze erfasst.

Für die Methode der real – time PCR mit dem LightCycler™ wurde eine Common Candida Sonde verwendet. Der Zeitaufwand für diese Methode beträgt circa eine Stunde und 30 Minuten, vorher muss jedoch die DNA extrahiert werden, was zusätzlich drei Stunden und 30 Minuten in Anspruch nimmt. Das Ergebnis der Untersuchung läge demnach innerhalb von fünf Stunden vor. Theoretisch besteht die Möglichkeit die manuelle Extraktion durch Extraktionsautomaten wie den MagnaPureLC zu ersetzen. Der Vorteil bestünde in der kürzeren Bearbeitungszeit und dem abgeschlossenen System, das Kontaminationen nahezu ausschließt.

Das LightCycler™ System liefert sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse der Proben. Mit dem Einsatz der Common Candida Sonde ist es zum gattungsspezifischen Candida – Nachweis in der Lage. Auch Mischinfektionen mit unterschiedlichen Candida spp waren kein Hindernis für den Nachweis. Das System ist zwar nicht in der Lage gleichzeitig mehrere Erreger nachzuweisen,, das Vorhandensein einer Mischinfektion verhindert aber nicht den Nachweis des einzelnen Erregers. In drei Fällen war es nicht möglich mit dem LightCycler™ die positiven Befunde der anderen

Methoden nachzuvollziehen. Umgekehrt lieferte der LightCycler™ aber keine positiven Ergebnisse, die durch die restlichen Verfahren nicht zu bestätigen gewesen wären.

Im Vergleich mit der mikrobiologischen Untersuchung zeigt der LightCycler Vorteile hinsichtlich des Zeitaufwandes bis zum endgültigen Ergebnis und der Sensitivität, da die Kultur in acht Fällen das positive Ergebnis der anderen Methoden nicht nachvollziehen konnte.

Der finanzielle Aufwand pro Probe liegt mit 5.50 Euro zwischen der Kultur als günstigste Methode und der Gelelektrophorese mit 10.70 Euro.

Die Anschaffungskosten liegen mit circa 70000 Euro allerdings wie die Kosten für einen Sequenzierungsautomaten im oberen Bereich.

Die Sequenzierung hat gemeinsam mit der Untersuchung durch Anlegen einer Kultur den Vorteil, dass sie speziesspezifische Ergebnisse liefert. Dies ist für die Auswahl des geeigneten Antimykotikums von großem Interesse, insbesondere beim Vorliegen von Infektionen mit primär azolresistenten Erregern wie *Candida glabrata* oder *Candida krusei*.

Die Sequenzierung ist der Kultur dann unterlegen, wenn Mischinfektionen vorliegen. Bei den vorliegenden Untersuchungen war dies zweimal der Fall. In den Proben befanden sich laut dem Ergebnis der Kultur sowohl *Candida albicans* als auch *Candida glabrata*, was eine Sequenzierung verhinderte.

Entscheidend ist jedoch dass in keinem Fall unterschiedliche Erreger ermittelt wurden. Die Unterschiede zwischen Kultur und Sequenzierung bestanden immer nur hinsichtlich Positivität oder Negativität der Proben. Die Kultur ermittelte in 37 Fällen ein positives Ergebnis, die Sequenzierung in 42 Fällen. Die Sequenzierung war insgesamt in drei Fällen nicht in der Lage, das positive Ergebnis der anderen Methoden nachzuvollziehen. Zweimal ist dies wahrscheinlich durch Mischinfektionen zu begründen, im dritten Fall waren keine Hinweise auf eine Mischinfektion vorhanden.

In einem Fall lieferte die Sequenzierung in Übereinstimmung mit der PCR – ELISA Methode ein positives Ergebnis, dem die anderen Methoden widersprachen.

Die mikrobiologische Untersuchung mittels Anlegen einer Kultur stellt das Standardverfahren zur Routineuntersuchung klinischer Proben dar.

Es ist die günstigste, aber zeitaufwendigste Methode, da das nach 24 Stunden vorliegende vorläufige Ergebnis bis zum Erhalt des endgültigen Ergebnisses nach insgesamt sieben Tagen nur unter Vorbehalt zu verwerten ist. In circa 10% der Fälle wird ein vorläufiger negativer Befund nach Ablauf der anschließenden sechs Tage positiv.

Der größte Vorteil der Kultur liegt sicher darin, dass auch Mischinfektionen kein Hindernis darstellen.

Die Sequenzierung allein würde in diesem Fall ein negatives Ergebnis zeigen. Bei den vorliegenden Untersuchungen hat sich jedoch auch gezeigt, dass die Kultur am häufigsten, nämlich in acht Fällen, nicht in der Lage war, ein positives Ergebnis der anderen Methoden nachzuvollziehen.

Eine Verbesserung des gegenwärtigen Routineverfahrens wäre möglicherweise durch eine sinnvolle Kombination der momentan zu Verfügung stehenden molekularbiologischen Testverfahren zu erreichen.

Für sich genommen weist keine der in der vorliegenden Arbeit angewandten Untersuchungen die entscheidenden Vorteile gegenüber der mikrobiologischen Untersuchung auf, um diese als Routineverfahren abzulösen.

Sowohl die Gelelektrophorese als auch die real – time – PCR mit dem LightCycler™ unter Verwendung der Common Candida Sonde zeigten zwar eine höhere Sensitivität, sind aber nicht zum speziesspezifischen Erregernachweis in der Lage und sind somit für sich genommen der Kultur unterlegen.

Die PCR – ELISA Methode widersprach hinsichtlich Positivität und Negativität in je vier Fällen dem Ergebnis der anderen Methoden. Sie ergab außerdem teilweise auch dann sehr hohe positive Werte, wenn alle anderen Verfahren negativ ausfielen. Zum speziesspezifischen Erregernachweis ist auch sie nicht in der Lage und kann die Kultur dadurch als einzelnes Verfahren ebenfalls nicht ersetzen.

Unter Einbeziehung aller relevanten Kriterien erweisen sich die Sequenzierung und die real – time - PCR als stärkste Konkurrenz für die mikrobiologische Untersuchung.

Aufgrund der begrenzten Sensitivität und dem hohen Zeitaufwand der Kulturellen Untersuchung als Standardverfahren zur Diagnostik invasiver Pilzinfektionen wird von vielen Arbeitsgruppen nach alternativen Diagnoseverfahren gesucht.

Um möglichst schnelle Diagnosestellung zu erreichen bieten sich insbesondere molekularbiologische Methoden an.

Van Burik et al. (67) erarbeiteten 1998 ein PCR – Protokoll zum unspezifischen Pilznachweis unter Verwendung von Sonden, mit dessen Hilfe die Erreger bis 4 CFU/ml Blut nachgewiesen werden konnten.

Eine Arbeitsgruppe um G. Sandhu entwickelte 1995 (66) 21 spezifische Sonden zur Detektion der interessanten *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Filobasidiella* spp sowie für *Histoplasma capsulatum*, *Pseudoallescheria boydii* und *Sporothrix schenckii*.

Auch die Kombination von konventioneller PCR und Sequenzierung wurde 1993 schon erfolgreich zur Amplifikation und Detektion von *Candida*-DNA

herangezogen (54). Es gelang der Nachweis von *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* und *Candida krusei*.

Dass auch die Kombination von konventioneller PCR und Gelelektrophorese oder EIA (enzym – linked immuno assay) schnell und sensitiv zum Ergebnis führt, haben Elie et al. 1998 (20) gezeigt.

Eine weitere Arbeitsgruppe (21) beschäftigte sich 2003 mit dem Vergleich von PCR-ELISA, mikrobiologischer Kultur und einem weiteren PCR-basierten Nachweisverfahren für *Candida*-DNA. Untersucht wurden 75 Blut - oder Liquorproben von ebenso vielen Patienten mit Verdacht auf Candidiasis,

davon waren 37 entweder in Kultur oder PCR Candida – positiv. Für vier Patienten wurde sowohl durch die Kultur als auch durch die PCR ein positives Ergebnis ermittelt, 21 waren in der Kultur positiv, aber in der PCR negativ. Fünf PCR – positive aber Kultur – negative waren im PCR – Elisa ebenfalls positiv. Die Werte für Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Vorhersagewert werden im Vergleich von PCR-ELISA zu Kultur plus PCR mit 13,5%, 11% und 54,3% angegeben.

Für das PCR-ELISA Verfahren ergab sich somit eine hohe Spezifität und geringe Bearbeitungszeit. Die mangelhafte Sensitivität und die fehlende Fähigkeit zur Speziesdifferenzierung stellen einen klinischen Nutzen aus der Sicht dieser Arbeitsgruppe jedoch in Frage.

Ein weiterer Vergleich zwischen Kultur und einem PCR-basierten Nachweisverfahren wurde 1993 von Burgener – Kairuz et al. (11) vorgenommen. Mit Hilfe der eingesetzten Primer konnte DANN von *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* und *Candida tropicalis* nachgewiesen werden. Verglichen wurden die Ergebnisse von Kultur und PCR von 80 klinischen Proben. Der Vergleich ergab eine Sensitivität, Spezifität und Effizienz von 71,95 und 83% für *Candida glabrata*.

Auch Agarosegele wurden zum Nachweis von *Candida* herangezogen und mit der PCR-ELISA Methode verglichen (23). Mit Hilfe des Agarosegels konnte *Candida*-DNA bis zu einer Konzentration von 10 Zellen /ml nachgewiesen werden. Für die PCR_ELISA Methode ergab sich eine Nachweisgrenze von 10 Zellen / ml Blut, womit eine zehnfach höhere Sensitivität erreicht wurde.

Die Methode der real-time PCR wurde ebenfalls zum Nachweis von *Candida* angewandt (48).

So konnte Imhof et al. 2003 (35) *Candida albicans* in einer Kultur – negativen Leberbiopsie nachweisen. In dieser Studie wurde gezeigt, dass *Candida*-spezies nicht nur in Blut (48), sondern auch in Gewebeproben mit Hilfe des Lightcyclers™ nachweisbar sind.

Auch White et al. (71) konnten mit Hilfe eines Lightcycler Systems sieben unterschiedliche Candida Spezies nachweisen und erreichten eine im Vergleich zur Kultur höhere Sensitivität.

Eine Arbeitsgruppe um Guiver etablierte 2001 (28) eine real-time PCR mit dem TaqMan Automaten zum Nachweis von *Candida albicans*, *C.parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C.krusei*, *C.kefyr*, *C.glabrata*.

Ebenfalls mit Hilfe des TaqMan konnten Brinkmann et al. 2003 (8) 17 verschiedene Candida Spezies sowie fünf weitere Hefen in Wasser mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% bis 1,2 Zellen detektieren.

Hier handelt es sich jedoch um einen unphysiologischen Ansatz, da im Wasser PCR – Inhibitoren, wie sie im Blut vorhanden sind, fehlen. Somit sind die Angaben zur Sensitivität nicht auf Blutproben übertragbar.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat die Medizin auf dem Gebiet der Onkologie und der Intensivmedizin entscheidende Fortschritte gemacht, die insbesondere bei der Bekämpfung invasiver Infektionen Probleme hinsichtlich Diagnostik und Therapie mit sich bringen.

Es sind in erster Linie immunsupprimierte Patienten, die ein erhöhtes Risiko aufweisen, an invasiven Infektionen zu erkranken. Das Erregerspektrum umfasst sowohl Bakterien als auch Pilze wie Aspergillus und Candida, deren Anteil in den letzten zwanzig Jahren ständig zugenommen hat.

Der wichtigste Risikofaktor für eine invasive Mykose ist eine lang anhaltende Immunsuppression mit schwerer Neutropenie wie zum Beispiel nach allogener Stammzelltransplantation. Aber auch eine antibiotische Therapie, Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus oder Zystische Fibrose, schwere Verbrennungen, Frühgeburtlichkeit oder invasive Therapien zählen zu den Risikofaktoren.

Trotz zunehmendem prophylaktischem Einsatz von Antimykotika bei Risikopatienten bleibt der Zeitpunkt der Diagnosestellung und Therapieinitiierung entscheidend für die Prognose der Patienten.

Da durch einen prophylaktischen Einsatz von Antimykotika nicht nur schwerwiegende Nebenwirkungen in Kauf genommen werden, sondern auch die Resistenzentwicklung forciert wird, ist eine frühe und speziesspezifische Diagnosestellung wichtig.

Die Klinik einer invasiven Mykose ist vor allem im entscheidenden Anfangsstadium sehr unspezifisch und muß durch den direkten Erregernachweis verifiziert werden.

Die Routinediagnostik zum Pilznachweis basiert momentan auf einer mikrobiologischen Untersuchung durch Anlegen einer Kultur.

Dieses Verfahren ist jedoch nicht immer in der Lage, vorliegende invasive Pilzinfektionen zuverlässig nachzuweisen. Ein großer Anteil der Infektionen wird nach wie vor erst post mortem diagnostiziert.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis solcher Infektionen bieten die in den letzten Jahren entwickelten molekularbiologischen Verfahren. Es handelt sich um PCR – basierte Verfahren, für die jedoch nur individuelle Protokolle existieren, die keine Standardisierung aufweisen. Die PCR zum DNA - Nachweis kann entweder als konventionelle PCR oder als real – time PCR durchgeführt werden. Der PCR vorgeschaltet ist immer die Extraktion der DNA , die entweder manuell oder mit Hilfe von Extraktionsautomaten wie dem MagnaPureLC durchgeführt werden kann.

Für die real – time PCR stehen Systeme wie der LightCycler™ zu Verfügung, der in der Lage, ist die Amplifikation und Detektion in einem Arbeitsschritt zu leisten. Konventionelle PCR – Verfahren amplifizieren die extrahierte DNA, die im Anschluß entweder durch Gelelektrophorese, ELISA oder eine Sequenzierung detektiert werden kann.

Die molekularbiologischen Nachweisverfahren bieten den Vorteil höherer Sensitivität, sind jedoch nicht alle ohne größeren zeitlichen Aufwand zum speziesspezifischen Erregernachweis in der Lage. Auch bei sehr geringer Pilzlast wie zum Beispiel im Blut sind die Pathogene teilweise bis zu einer Pilzlast von 10 CFU / ml nachweisbar.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die zu Verfügung stehenden Methoden zum Pilznachweis in verschiedenen klinisch relevanten Materialien mit der Routinediagnostik zu vergleichen. Untersucht wurden insgesamt 94 Proben bestehend aus Trachealsekret, Sputum, abdominellem Drainagematerial,

Katheterurin und Vollblutproben von 31 intensivmedizinisch betreuten Patienten. Außerdem wurden Vollblutproben eines gesunden Probanden mit *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae* und *Candida parapsilosis* versetzt und ebenfalls untersucht.

Bei den intensivmedizinisch betreuten Patienten handelte es sich um eine sehr heterogene Patientengruppe, die viele der oben genannten Risikofaktoren aufwies. So standen zwei Patienten nach Transplantationen unter Immunsuppression, die anderen wurden wegen chronisch entzündlichen Grunderkrankungen, Polytraumata, Erkrankungen des Herz – Kreislaufsystems, sowie Komplikationen nach gastrointestinalen – sowie hirnchirurgischen Eingriffen behandelt. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 61 Jahre, sieben Patienten standen zum Zeitpunkt der Probeentnahme unter antimykotischer Therapie, vier Patienten verstarben im Rahmen septischer Komplikationen.

Alle Patientenproben wurden nach der manuellen Extraktion zunächst in einen PCR – ELISA eingesetzt, und die extrahierte DNA mittels LightCycler™ unter Verwendung einer Common Candida Sonde untersucht. Nach einer weiteren PCR wurde vom Amplifikationsprodukt eine Gelelektrophorese angefertigt und das restliche Material mittels Sequenzierung untersucht.

Parallel zu diesen Untersuchungen gingen Proben derselben Materialien innerhalb der Routinekontrolle an das Mikrobiologische Institut der Universität Tübingen und wurden dort durch Anlegen von Kulturen mikrobiologisch untersucht.

Die mit den *Candida* spp versetzten Vollblutproben wurden ebenfalls mittels Gelelektrophorese, LightCycler™ und Sequenzierung untersucht, wobei der Pilznachweis mit Hilfe aller Methoden möglich war.

Beim Vergleich der verschiedenen Nachweismethoden zeigte sich, dass die mikrobiologische Untersuchung mittels Anlegen einer Kultur am häufigsten nicht in der Lage war, die übereinstimmend positiven Ergebnisse der anderen Methoden nachzuvollziehen. Dies war acht Mal der Fall. Die PCR – ELISA

Methode konnte dies in vier Fällen nicht, LightCycler™ und Sequenzierung in je drei Fällen nicht. Die Gelelektrophorese hatte hier keine Schwierigkeiten.

In je einem Fall lieferten Sequenzierung und Kultur ein positives Ergebnis, dem alle anderen Methoden widersprachen. Bei der PCR –ELISA Methode war dies vier Mal, bei der Gelelektrophorese einmal der Fall.

Sowohl die Sequenzierung als auch die Kultur sind im Gegensatz zu den anderen Verfahren zum speziesspezifischen Erregernachweis in der Lage. Die Sequenzierung versagt jedoch beim Vorliegen von Mischinfektionen, da sie hier ein negatives Ergebnis liefert.

Der Zeitaufwand bis zur endgültigen Diagnose ist bei den verschiedenen Methoden sehr unterschiedlich, Am schnellsten ist das LightCycler™ System mit 5 Stunden, gefolgt von der Gelelektrophorese mit 9 Stunden. Die PCR –ELISA benötigt 11 Stunden und 45 Minuten, das Sequenzierungsergebnis liegt am Morgen des dritten Arbeitstages vor. Die Kultur ermittelt ein vorläufiges Ergebnis nach 24 Stunden, das jedoch in circa 10 % der Fälle nach 7 Tagen durch das endgültige Ergebnis korrigiert werden muss.

Ein entscheidender Vorteil der molekularbiologischen Methoden gegenüber der mikrobiologischen Kultur wäre mit der Erfüllung von vier Kriterien gegeben. Zum ersten muss die Methode zur exakten Speziesbestimmung in der Lage sein, und auch Mischinfektionen dürfen kein Problem darstellen. Des Weiteren sollte ein Zeitvorteil zu erkennen und eine höhere Sensitivität zu erreichen sein.

Diese Kriterien erfüllt jedoch keine der molekularbiologischen Methoden für sich allein.

Aus diesem Grund wäre eine Verbesserung der Routinediagnostik nur durch eine Kombination dieser Methoden, zum Beispiel von Gelelektrophorese und Sequenzierung denkbar.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Aisner, J., Schimpff, S., Wiernik, P. (1977)
Treatment of invasive aspergillosis: relation of early diagnosis and treatment response
Annals of Internal Medicine 86, 539 – 543
- (2) Anaissie, E. (1992)
Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: Experience at a cancer center and review
Clin. Infect. Dis. 14, 43 – 53
- (3) Ascoglu, S., Rex, J.H., de Pauw, B., Bennett, J.E., Bille, J., Crockaert, F., Denning, D.W., Donnelly, J.P., Edwards, J.E., Erjavec, Z., Fiere, D., Lortholary, O., Maertens, J., Meis, J.F., Patterson, T.F., Ritter, J., Selleslag, D., Shah, P.m., Stevens, D.A., Walsh, T.J., on behalf of the Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for research and treatment of cancer and Mycoses Study
Group of the national Institute of Allergy and Infectious Disease (2002)
Defining Opportunistic Invasive fungal Infections in Immunocompromised Patients with cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An international consensus
Clin. Infect. Dis. 34, 7 – 14
- (4) Banerjee, S.N., Emori, T.G., Culver, D.H., Gaynes, R.P., Jarvis, W.R., Horan, T., Edwards, J.R., Tolson, J., Henderson, T., Martone, W.J., (1991)
National Nosocomial Infections Surveillance System
Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States
Am. J. Med. 91, 86 – 89
- (5) Beck – Sague, C.M., Jarvis, W.R. (1993)
National Nosocomial Infections Surveillance System
Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980 – 1990
J. Infect. Dis. 167, 1247 – 1251
- (6) Bille, J., Stockman, L., Roberts, G.D. (1982)
Detection of yeasts and filamentous fungi in blood cultures during a 10 – year period (1972 – 1982)
J. Clin. Microbiol. 16, 968 – 970

- (7) Bodey,G., Bueltmann,B., Duguid,W., Gibbs,D., Hanak,H., Hotchi,M., Mall,G., Martino,P., Meunier,F., Milliken,S. (1992)
Fungal infections in cancer patients: An international autopsy survey
Eur.J.Clin.Mikrobiol Infekt.Dis. 11, 99 – 109
- (8) Brinkmann,N.,Haugland,R., Wymer,I., ByappanahalliM.,Whitman,R., Vesper,S (2003)
Evaluation of a rapid, quantitative real-time-PCR method for the enumeration of pathogenetic Candida cells in water
Applied and Environmental Microbiology 1775-1782
- (9) Buchman,T.D., Rossier,M., Merz,W.G., Charache,P. (1990)
Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of Candida albicans by in vitro amplification of a fungus – specific gene
Surgery 108, 338 – 347
- (10) Büchner,T.,Fegeler,W.,Bernhardt,H., Brockmeyer,N., Duswald,K.H., Hermann,M., Heuser, D., Jehn, U., Just – Nübling,G., Karthaus, M., Maschmeyer,G., Müller,F.M., Müller,J., Ritter,J., Roos,N., Ruhnke,M.,Schmalreck,A., Schwarze,R., Schwesinger,G., Silling,G. (2002)
Treatment of severe Candida Infections in High – Risk – Patients in Germany: Consensus – formed by a Panel of Interdisciplinary Investigators
Eur. J. Clin. Microbiol. Infekt.Dis. 21, 337 – 352
- (11) Burgener – Kairuz,P., Zuber,J.P., Jaunin,P., Buchmann,T.G., Bille,J., Rossier,M. (1994)
Rapid detection and identification of Candida albicans and Torulopsis (Candida) glabrata in clinical specimens by species – specific nested PCR amplification of a cytochrom P – 450 lanosterol – alpha – demethylase (L1A1) gene fragment
J.Clin.Microbiol. 32, 1902 – 1907
- (12) Burnie,J.P., Golbang,N., Matthews,R.C. (1997)
Semiquantitative polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosis of disseminated candidiasis
Eur.J.Clin.Microbiol. 16, 346 – 350
- (13) Chandrasekar,P.h., Weinmann,A., Shearer,C. (1995)
Autopsy identified infections among bone marrow transplant recipients: A clinicopathologic study of 56 patients
Bone marrow Transplant 16, 675 – 681

- (14) Denning,D.W. (1994)
Evolving etiology of fungal infection in the 1990s
Infect.Dis.Clin.Pract. 3, 50 – 55
- (15) Duthie,D., Denning,D.W. (1995)
Aspergillus fungemia : report of 2 cases and review
Clin.Infect.Dis. 20, 598 – 605
- (16) Einsele,H.,Steidle,M.,Vallbracht,A.,Saal,J.G.,Ehninger,G.,
Müller,C.A. (1991)
Early occurrence of human cytomegalievirus infection after bone
marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain
reaktion technique
Blood 86 (7), 2815 - 2820
- (17) Einsele,H.,Ehninger,G., Hebart,H.,Wittkowski,K., Schuler,U.,
Jahn,G., Mackes,P., Herter,M., Klingebiel,T., Löffler,J. (1995)
Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of
cytomegalievirus disease and the duration and the side effects of
antiviral therapie after bone marrow transplantation
Blood 86(7), 2815 – 2820
- (18) Einsele,H., Hebart,H., Roller,G., Löffler,J., Rothenhöfer,I.,
Müller,C.A., Bowden,R.A., von Burik,J.A., Kanz,L., Schumacher,U.
(1997)
Detection and identification of fungal pathogenes in blood by
using molecular probes
J.Clin.Microbiology 35, 1353 – 1360
- (19) Einsele,H., Bertz,H., Beyer,J., Kiehl,M.G., Runde,V., Kolb,H.J.,
Holler,E., Beck,R., Schwerdfeger,R., Schumacher,U., Hebart,H.,
Martin,H., Kienast,J., Ullmann,A.J., Maschmeyer,G., Krüger,W.,
Link,H., Schmidt C.A., Oettle,H., Klingebiel,Z., für die
Arbeitsgemeinschaft Infektionen der Deutschen Gesellschaft für
Hämatologie und Onkologie (2001)
Epidemiologie und interventionelle Therapiestrategien infektiöser
Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation
Dtsch.Med.Wochenschr. 126, 1278 – 1284
- (20) Elie,C.M., Lott,T.J., Reiss,E., Morrison,C.J. (1998)
Rapid identification of Candida species with species – specific DNA
probes
J.Clin.Microbiol. 36(11), 3260 – 3265

- (21) Elsayed,M.D.,Fitzgerald,V.,Massey,V.,Hussain,Z., (2003)
Evaluation of the CandigenEnzyme-linked-Immunsorbent Assay
For Quantitive Detection of Candida Species Antigen
Archives of Pathology and Laboratory Medicine Vol.125, No.3,334
-346
- (22) Flahaut, M., Sanglard,D., Monod,M., Bille,J., Rossier,M. (1998)
Rapid detection of Candida albicans in clinical samples by DNA
amplification of common regions from C.albicans – secreted aspartic
proteinase genes
J.Clin.Microbiol. 36, 395 – 401
- (23) Fujita,S., Lasker,B.A., Lott,T.J., Reiss,E., Morrison,C.J. (1995)
Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR – amplified
DNA from Candida species in blood
J-Clin.Microbiol. 33, 962 – 967
- (24) Glabal,M., (1992)
Development of a chromosomal DNA probe for the laboratory
diagnosis of aspergillosos
Mycopathologia 106, 121 – 129
- (25) Golbang,N., Burnie,J.P., Matthews,R.C. (1999)
A polymerase chain reaction enzyme immunoessay for diagnosing
infection caused by Aspergillus fumigatus
J.Clin.Pathol. 52, 419 – 423
- (26) Grauer,M.E., Bokemeyer,C., Welte,T., Freund,M., Link,H. (1993)
Sucessful treatment of mucor pneumonia in a patient with relapsed
lymphoblastic leukemia after bone marrow transplantation
Bone marrow transplant 12, 421
- (27) Groll,A.H., Shah,P.M., Mentzel,C., Schneider,M., Just – Nübling,G.,
Hübner,G. (1996)
Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infection
at a university hospital
J.Infect. 33, 23
- (28) Guiver,M., Levi,K., Oppenheim,B.A. (2001)
Rapid identification of Candida species by Taq Man PCR
J.Clin.Pathol. 54,362-366
- (29) Gumbo, T., Isada,C.M., Hall,G., Karafa,M.T., Gordon,S:M., (1999)
Candia Glabrata Fungemia. Cinical features of 139 patientes
Medicine (Baltimore) 78,220 – 227

- (30) Gutierrez,J., Maroto,C., Piedrola,G., Martin,E., Perez,J.A. (1993)
Circulating candida antigens and antibodies: useful markers of candidemia
J.Cil.Microbiol. 31, 2550 – 2552
- (31) Hebart,H., Bokemeyer,C., Löffler,J., Schumacger,U., Kanz,L., Eisele,H. (1997)
New aspects for the diagnosis of invasive fungal disease in oncological patients
Onkologie 20, 99 – 104
- (32) Hebart,H., Bokemeyer,C., Löffler,J., Schumacher,U., Kanz,L., Einsele,H. (1999)
Management of invasive fungal infections in oncological patients
Onkologie 22, 192 – 197
- (33) Hebart,H., Löffler,J., Kanz,L., Einsele,H. (2000)
Molecular methods in the diagnosis of infections in the immunocompromised host
Current Opinion in Infectious diseases 13 , 355 – 359
- (34) Henry,T., Iwen,P.C., Hinrichs,S.H. (2000)
Identification of aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2
J.Clin.Microbiol. 38, 1510 – 1515
- (35) Imhof,A., Schaer,C., Schoedon,G., Walter,R.B., Schaffner,A., Schneemann,M. (2003)
Rapid Detection of Pathogenic Fungi from clinical Specimens using Lightcycler Real-time-fluorescence-PCR
Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 22,558-560
- (36) Jantunen,E., Anttila,V.J., Ruutu,T. (2002)
Aspergillus infections in allogenic stem cell transplant recipients : have we made any progress?
Bone marrow transplant 30, 925 – 929
- (33) Jarvis,R.W., Martone,W.T. (1992)
Predominant pathogens in hospital infections
J.Antimicrob.Chemother. 29, 19 – 24
- (37) Jarvis,R.W. (1995)
Epidemiology of nosocomial fungal infections with emphasis on candida species
Clin.Inf.Dis. 20, 1526 – 1530

- (38) Jarvis,R.W. (1995)
Epidemiology of nosocomial fungal infections with emphasis on
Candida species
Clin.Inf.Dis. 20,1526-1530
- (39) Jordan,J.A. (1994)
PCR identification of four medically important Candida species by
using a single primer pair
J.Clin.Microbiol. 32, 2962 – 2967
- (40) Karow,T., Lang – Roth, R. (2003)
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 614 - 621
7. Auflage, Köln
- (41) Kobayashi,M., Sonobe,H., Ikezoe,T., Hakoda,E., Ohtsuki,Y.,
Taguchi,H. (1999)
In situ detection of aspergillus 18 s ribosomal RNA in invasive
pulmonary aspergillosis
Intern.Med. 38, 563 – 569
- (42) Kremery,V., Krupova,I., Denning,D.W. (1999)
Invasive yeast infections other than Candida spp. In acute
leukaemia.
J. Hosp. Infect. 41 (3) , 181 – 194
- (43) Latge,J.P. (1999)
Aspergillus fumigatus and invasive aspergillosis
Clin.Microbiol.Rev. 12, 310 – 350
- (44) Lewin,B. (2000)
Genes
Oxford University Press
- (45) Lewis,R.E., Klepser M.E. (1999)
The changing face of nosocomial candidemia: epidemiology,
resistence and drug therapie
Am.J.Health Syst.Pharm. 56(6), 525 – 533
- (46) Löffler,J., Hebart,H., Schumacher,U., Reitze,H., EinseleH. (1997)
Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal
pathogens from cultures and blood
J.Clin.Microbiol. 36, 275 – 279

- (47) Löffler,J., Hebart,H., Sepe,S., Schumacher,U., Kliengebiel,T., Einsele,H. (1998)
Detection of PCR – amplified fungal DNA by using a PCR – ELISA system
Med.Mycol. 36, 275 – 279
- (48) Löffler,J., Henke,N., Hebart,H., Schmidt,D., Hagemeyer,L., Schumacher, U., Einsele,H. (2000)
Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler System
J.Clin.Microbiol. 38, 586 – 590
- (49) Löffler,J., Schmidt,K., Hebart,H., Schumacher,U., Einsele,H. (2002)
Automated extraction of genomic DNA From medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagnaPureLC system
J.Clin.Microbiol. 40, 2240 – 2243
- (50) Marre, Mertens, Trautmann, Vanek
Klinische Infektologie
2000
- (51) Melchers,W.J.G., Yerweij, van den Hurk,P., Van Belkum,A., De Pauw, B.E., Hoogkamp – Korstanje,J.A.A., Meis,J.F.G.M. (1994)
General primer – mediated PCR for detection of aspergillus species
J.Clin.Microbiol. 32, 1710 – 1717
- (52) Meyers,J.D. (1990)
Fungal infections in bone marrow transplant patients
Semin. Oncol. 17, 10 – 13
- (53) Muller,F.M., Trusen,A., Weig,M. (2002)
Clinical manifestations and diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised children
Eur.J.Pediatr. 161, 563 – 574
- (54) Niesters,H.G.M., Goessens W.H.F., Meis,J.F.M.G., Quint,W.G.Y. (1993)
Rapid polymersase chain reaction – based identification assays for Candida species
J.Clin.Microbiol. 31, 904 – 910
- (55) Nguyen,M.H., Peacock,J.E.Jr., Morris,A.J. et al. (1996)
The changing face of candidemia: emergence of non – Candida albicans species and antifungal resistance
Am.J.Med. 100, 617 – 623

- (56) Nguyen,M.H., Yu CH, Y. (1998)
Voriconazol against fluconazol – susceptible and resistant Candida isolates: in vitro efficacy compared with that of itraconazol and ketoconazol
J.Antimicrob.Ther. 42, 253 – 256
- (57) Nucci,M., Colombo,A.L., Spector,N. et al (1997)
Breakthrough candidemia in neutropenic patients
Clin.Inf.Dis. 24, 275 – 276
- (58) Pagano,L., Antinori,A., Ammassari,A., Mele,L., Nosari,A., Melillo,L., Martino,B., Sanguinetti,M., Equitani,F., Nobil, F., Carotenuto,M., Morra, E., Morace,G., Leone,G. (1999)
Retrospective study of candidemia in Patients with hematological malignancies. Clinical features, risk factors and outcomes of 76 episodes
Eur.J.Haematol. 63, 77 – 85
- (59) Paya,C.V. (2002)
Prevention of fungal infection in transplantation
Transl.Infect.Dis. 4, 46 – 51
- (60) Pfaller,M.A., Jones,R.N., Doern,G.V., Fluit,A.C., Verhoef,J., Sader,H.S., Messer,S.A., Houston,A., Coffman,S., Hollis,R.J. (1999)
International surveillance of blood stream infections due to Candida species in the european SENTRY – Program : species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazol and echinocandin agents. SENTRY Participant group (Europe)
Diagn.Microbiol.Infect.Dis. 35(1),19 – 25
- (61) Pfaller,M.A., Jones,R.N., Doern,G.V., Sader,H.S., Messer,S.A., Houston A., Coffman,S., Hollis,R.J. (2000)
Bloodstream infections due to candida species: SENTRY antimicrobial surveillance program in north america and latin america, 1997 – 1998
Antimicro.Agents Chemother. 44(3),747 – 751
- (62) Rex,J.h., Walsh,T.J.; Sobel,J.D., Filler,S.G., Pappas,P:G:, Dismukes, W.e., Edwards,J.E. (2000)
Practice guidelines for the treatment of candidiasis
J.Inf.Diseases 30, 662 – 678
- (63) Sandhu,G., Kline,B., Stockman,L., Roberts,G. (1995)
Molecular probes for diagnosis of fungal infections
J.Clin.Microbiol. 33, 2913 – 2919

- (64) Schmidt,U., Pfaffenbach,B., Quabeck,K., Donhuijsen,K. (1991)
Fungal infections in bone marrow transplantation – a post mortem analysis
Mycoses 34, 33 – 35
- (65) Spreadbury,C., Holden,D., Aufauvre – Brown,A., Bainbrigge,B., Cohen,J. (1993)
Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction
J.Clin.Microbiol. 31, 615 – 621
- (66) Stevens,D.A. (2002)
Diagnosis of fungal infections: current status
J.Antimicrobiol.Chemother. 49, 11 – 19
- (67) Van Burik,J.A., Myerson,D., Schreckhise,W., Bowden,R.A. (1998)
Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens
J.Vlin.Microbiol. 36, 1169 – 11
- (68) Verduyn Lunel,F.M., Meis,J.F., Voss,A. (1999)
Nosocomial fungal infections: candidemia
Diagn.microbiol.Infect.Dis. 34, 213 – 220
- (69) Verweij,P.E., Meis,J.F.G.M. (2000)
Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients
Transpl.Infect.Dis. 2, 80 – 87
- (70) Walsh,T.J., Finberg,R.W., Arndt,C. (1999)
Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and/ in neutropenia
N.Engl.J.Med. 340, 764
- (71) White,P.L.,Shetty,A.,Barnes,R.A. (2003)
Detection of seven candida species using the Lightcycler system
J.Med.Microbiol. 52,229-380
- (72) Williamson,E.C.M., Mullar,M.R., Steward,C.G., Cornish,J.M., Foot, A.B.M., Oakhill,A., Pamphilon,D.H., Reeves,B., Caul,E.O., Warnock, D.M.,Marks,D.I. (1999)
Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation
Br.J.Haematol. 104, 560 – 568

- (73) Wingard, J.R. (1995)
Importance of Candida species other than Candida albicans as pathogens in oncology patients
Clin, Inf, Dis. 20, 1125 – 1156
- (74) [Www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/Blast.cgi)
- (75) Yamakami, Y., Hasimoto, A., Yamagata, E., Kamberi, P., Karashima, R., Nagai, H., Nasu, M. (1998)
Evaluation of PCR for detection of DNA specific for Aspergillus species I sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis
J. Clin. Microbiol. 36, 3619 – 2623

Anhang

Abkürzungen

AA	Aortenaneurysma
Alb.	albicans
Allerg.	allergisch
Ampho B	Amphotericin B
Art.	Arteriel
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bauchaortenaneurysma
BAL	Broncho – Alveoläre Lavage
bes.	besonders
bzw	beziehungsweise
C.	Candida
°C	Grad Celsius
CA	Carcinom
ca.	circa
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C – reaktives Protein
CT	Computertomographie
d	Tage
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
D.m.	Diabetes mellitus
E.	Enterococcus

EDTA	Ethyldiaminessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbend Assay
EORTC	European Organisation for Research on Treatment of
	Cancer
fg	femtogramm
glabr.	glabrata
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
KHK	Koronare Herzkrankheit
krus.	krusei
li.	linke
lus.	lusitaniae
M	Molar
M.	Morbus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
min	Minuten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MRT	Magnet – Resonanz - Tomographie
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTP	Nukleosidtriphosphat
NW	Nebenwirkungen
P.	Patient
parap.	parapsilosis
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase – Ketten - Reaktion
re.	rechts
SAB	Subarachnoidalblutung
sec	Sekunden
s.o.	siehe oben
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Trisdoxymethylethylendiamin
trop.	tropicalis
V.	Vena
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.Bsp.	Zum Beispiel
ZVK	Zentraler Venenkatheter

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die mich bei der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

Mein Dank gilt insbesondere meinem Mann Andreas und meinen Eltern, die mir immer zur Seite standen.

Besonders Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Einsele sowie unserem Freund PD Dr. Jürgen Löffler für die gute Betreuung.

Eine große Hilfe waren mir außerdem Frau PD Dr. Schuhmacher, Frau PD Dr. Heininger und alle Labormitarbeiter.

Lebenslauf

Name	Hanna Baumann, geb. Baur
Geburtsdatum	17.09.1977
Geburtsort	Böblingen
Eltern	Dr. med. Saskia Baur, geb. Tilke Dr. med. Gerhard Baur
1983 - 1987	Besuch der Grundschule in Dietersweiler und Pfalzgrafenweiler
1987 – 1997 1997	Besuch des Kepler – Gymnasiums in Freudenstadt Ablegen der Reifeprüfung
04/1998	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig – Maximilians – Universität München
10/1998	Studienortwechsel an die Eberhard – Karls – Universität Tübingen
03/2001	Ärztliche Vorprüfung

03/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2002 – 03/2003	Durchführung der Versuche für die vorliegende Dissertationsarbeit
04/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation