

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
(Prof. Dr. med. Uwe Groß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Korrelation der 5-Flucytosin-Resistenz
in *Candida albicans* mit Markerpeak im
MALDI-Massenspektrum durch neue
Extraktionsmethode**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Claudia Maria Sybille Libussa Folba

aus

Henstedt-Ulzburg

Göttingen 2023

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in	Prof. Dr. med. U. Groß
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Abdul Rahman Asif

Datum der mündlichen Prüfung: 06.03.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Korrelation der 5-Flucytosin-Resistenz in *Candida albicans* mit Markerpeak im MALDI-Massenspektrum durch neue Extraktionsmethode" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die klinische Bedeutung von <i>Candida</i> -Arten.....	1
1.2 Morphologie und Genetik	3
1.2.1 Phänotyptransition und Parasex	3
1.3 Typisierung von <i>C. albicans</i>	4
1.3.1 MLST	5
1.4 Medikamentöse Therapie und Resistenzen.....	6
1.4.1 Bestimmung von Sensibilität und Resistenz	6
1.4.2 5-Flucytosin.....	7
1.4.3 Azole mit Leitsubstanz Fluconazol	8
1.5 Matrix-assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung-Flugzeitanalyse- Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS).....	11
1.5.1 Funktionsweise	11
1.5.2 Klinische Bakteriologie.....	13
1.5.3 Klinische Mykologie	15
1.6 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 <i>C.-albicans</i> -Stammsammlung.....	19
2.1.2 Puffer und Medien	19
2.1.3 Lösungen	20
2.1.4 Primer.....	20
2.1.5 Laborausstattung	21
2.1.6 Geräte.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 DNA-Extraktion und Normierung	22
2.2.2 PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung von <i>FUR1</i>	22
2.2.3 PCR und Gelelektrophorese von <i>MTLa</i> und <i>MTLα</i>	23
2.3 MALDI-TOF MS.....	24
2.3.1 Matrixlösung mit Insulin	24
2.3.2 Extraktionsmethode.....	24
2.3.3 Variationen der Extraktionsmethode.....	25
2.3.4 Acetonitril-Fastprep-Methode.....	26
2.3.5 Acetonitril-Fastprep-Methode mit Ethanol-Waschschritt.....	26

2.3.6	Datenerhebung und Analysetools.....	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Extraktionsmethode für alle Stämme.....	28
3.2	Veränderungen am Extraktionsprotokoll für MALDI-TOF MS	29
3.2.1	Vergleich Fest- und Flüssigkultur	29
3.2.2	Variation des Materialeinsatzes	29
3.2.3	Variation Ameisensäurekonzentration.....	29
3.2.4	Zusatz von TCA im Ethanol-Waschschritt	30
3.2.5	Variation Matrixsubstanz	30
3.3	Etablierung einer neuen Extraktionsmethode (Acetonitril-Fastprep-Methode)	32
3.3.1	Acetonitril-Fastprep-Methode.....	32
3.3.2	Acetonitril-Fastprep-Methode mit Ethanol-Waschschritt.....	33
3.3.3	Acetonitril-Fastprep-Methode für alle Stämme und Vergleich mit den MLST-Kladen	34
3.3.4	PCR-Analyse und Sequenzierung des <i>FUR1</i> -Gens	34
3.3.5	PCR-Analyse des <i>MTL</i> -Locus und Gelelektrophorese.....	35
3.3.6	Ergebnisübersicht.....	35
3.3.7	Statistische Auswertung.....	36
4	Diskussion	43
4.1	Die MALDI-Extraktionsmethode zeigt gute Ergebnisse, jedoch keine visuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Spektren.....	43
4.2	Durch Variationen der Extraktionsmethode kann keine Verbesserung erzielt werden.....	44
4.3	Durch eine neue Extraktionsmethode kann das Spektrum so verbessert werden, dass Peakunterschiede sichtbar werden.....	46
4.4	Signifikante Korrelation des Peakmusters B mit 5FC- Resistenzgenotyp, keine Korrelation mit <i>MTL</i> -Locus oder MLST-Klade.....	49
4.5	Limitationen und Ausblicke.....	50
5	Zusammenfassung.....	53
6	Literaturverzeichnis	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die Lage der MLST-Sequenz-Gene.....	6
Abbildung 2: Transport von 5FC in die Zelle sowie die Umwandlung und Wirkmechanismus innerhalb der Zelle.....	8
Abbildung 3: MALDI-TOF-MS-Spektrum von <i>C. albicans</i>	13
Abbildung 4: Spektren bei Verwendung verschiedener Ameisensäure-Konzentrationen.....	30
Abbildung 5: Peakunterschiede im MALDI-Spektrum.....	33
Abbildung 6: Methodenvergleich am Beispiel des Stammes EU1001.	34
Abbildung 7: Gelelektrophorese der <i>FUR1</i> -PCR-Produkte.....	35
Abbildung 8: Vergleich MLST-Dendrogramm (links) und MALDI-Dendrogramm (rechts).	42
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Chromosom-5-Allels.....	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verschiedene Manifestationsformen der <i>Candida</i> -Erkrankung.....	1
Tabelle 2: Übersicht über verwendete Puffer und Medien.....	19
Tabelle 3: Übersicht über verwendete Lösungen.....	20
Tabelle 4: Übersicht über verwendete Primer.....	20
Tabelle 5: Übersicht über verwendete Laborausstattung.....	21
Tabelle 6: Übersicht über verwendete Geräte.....	21
Tabelle 7: Mastermix für die <i>FUR1</i> -PCR.....	23
Tabelle 8: PCR-Programm für die <i>FUR1</i> -PCR.....	23
Tabelle 9: Mastermix für die <i>MTL</i> -PCR.....	24
Tabelle 10: PCR-Programm für die <i>MTL</i> -PCR.....	24
Tabelle 11: Verteilung der Kladen über die untersuchten Stämme.....	28
Tabelle 12: Variationen am Extraktionsverfahren zur Verbesserung der Spektrenqualität.....	30
Tabelle 13: Auflistung der Ergebnisse der <i>FUR1</i> ₃₀₁ -Sequenzierung, <i>MTL</i> -Locus-PCR, Markerpeaks aus den durch Acetonitril-Fastprep-Methode gewonnenen MALDI-Spektren und die Zuordnung zur MLST-Klade.....	36
Tabelle 14: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des <i>FUR1</i> -Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters B.....	37
Tabelle 15: Statistische Auswertung für die Merkmale <i>FUR1</i> -Genotyp und Peakmuster B.....	37
Tabelle 16: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des <i>FUR1</i> -Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters A.....	38
Tabelle 17: Statistische Auswertung für die Merkmale <i>FUR1</i> -Genotyp und Peakmuster A.....	38
Tabelle 18: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des <i>FUR1</i> -Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters AC.....	38
Tabelle 19: Statistische Auswertung für die Merkmale <i>FUR1</i> -Genotyp und Peakmuster AC.....	39
Tabelle 20: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des <i>FUR1</i> -Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters BC.....	39
Tabelle 21: Statistische Auswertung für die Merkmale <i>FUR1</i> -Genotyp und Peakmuster BC.....	39
Tabelle 22: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des <i>FUR1</i> -Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters C.....	40
Tabelle 23: Statistische Auswertung für die Merkmale <i>FUR1</i> -Genotyp und Peakmuster BC.....	40
Tabelle 24: Zusammenfassung der Merkmalskombinationen (<i>FUR1</i> -Genotyp mit Peakmuster) und den resultierenden <i>p</i> -Werten.....	40

Abkürzungsverzeichnis

2,5-DBH	<i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i> , 2,5-Dihydroxybenzoesäure
5FC	5-Flucytosin
5FU	5-Fluorouracil
CCI	<i>composite correlation index</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DST	<i>diploid sequence type</i> , diploider Sequenztyp
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GOF	<i>gain of function</i>
HCCA	<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> , α-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure
ICMS	<i>intact cell mass spectrometry</i> , intakte Zell-Massenspektrometrie
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> , Verlust der Heterozygotie
m/z	<i>mass to charge ratio</i> , Masse-Ladungs-Quotient
MALDI-TOF MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry</i> , Matrix-assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung-Flugzeit-Massenspektrometrie
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i> , minimale Hemmkonzentration
MLP	<i>microsatellite length polymorphisms</i>
MLST	<i>multi locus sequence typing</i>
MPCC	<i>minimal profile change concentration</i>
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSP	<i>main spectra</i>
MTL	<i>mating type-like locus</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
SA	<i>sinapic acid</i> , Sinapinsäure
TOF	<i>time of flight</i> , Flugzeit
UPRTase	Uracilphosphoribosyltransferase

1 Einleitung

1.1 Die klinische Bedeutung von *Candida*-Arten

Candida sind Hefen und sehr häufig vorkommende Mikroorganismen des Menschen, die zur normalen Flora des Magen-Darm-Traktes und des Urogenitaltraktes gehören. Für 30 – 70 % aller gesunden Menschen gehört mindestens eine *Candida*-Art zum ständigen Begleiter, ohne dass Symptome sichtbar wären (Kam und Xu 2002; Kumamoto 2011). Unter den mehr als 150 *Candida*-Arten ist nur ein kleiner Teil in der Lage, beim Menschen Schaden anzurichten. Zu diesen zählen hauptsächlich *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliensis* und *Candida parapsilosis* (Kam und Xu 2002; Kumamoto 2011). Erkrankungen, die durch *Candida* ausgelöst werden, reichen von oberflächlichen, lokalen Infektionen bis zu schwerwiegenden Fällen von invasiver *Candida*-Sepsis (Tabelle 1). Bei 75 % aller Frauen kommt es in ihrem Leben mindestens einmal zu einer vulvovaginalen *Candida*-Infektion, bei der in der überwiegenden Anzahl der Fälle der Auslöser *C. albicans* ist (Sobel 1997).

Tabelle 1: Verschiedene Manifestationsformen der *Candida*-Erkrankung

Mukokutane Form	<ul style="list-style-type: none"> - Orale Infektionen - Ösophagitis - Vaginitis - Balanitis - Nagelinfektionen
Systemische Form	<ul style="list-style-type: none"> - Candidämie - <i>Candida</i>-Sepsis - Disseminierte Candidiasis mit Organmanifestation wie zum Beispiel <i>Candida</i>-Endokarditis oder <i>Candida</i>-Meningitis

Risikofaktoren für die vermehrte Besiedlung beziehungsweise Infektionen mit *C. albicans* sind Schwangerschaft, Diabetes mellitus, erhöhtes Alter und ein verminderter Immunstatus wie zum Beispiel durch eine HIV-Infektion. Zudem scheint das Tragen von Zahnprothesen sowie die Behandlung mit Antibiotika und/oder Kortikoiden eine Rolle zu spielen (Odds 1988; Lockhart et al. 2003).

C. albicans ist zudem verantwortlich für den Großteil oraler sowie systemischer Candidiasis (Moran et al. 2004; Thompson et al. 2010; Zomorodian et al. 2011). Auch Fungämien, ob nosokomial oder ambulant erworben, sind überwiegend durch *C. albicans* ausgelöst (Pfaller et al. 2010b). Bei Krankenhaus-Patienten ist *C. albicans* der Hauptauslöser von durch Pilzen ausgelösten wiederkehrenden Infektionen, Ausbrüchen oder nosokomialen Infektionen (Lortholary et al. 2011).

Aus einer Besiedlung oder oberflächlichen Infektion kann sich eine invasive Mykose bis hin zur Candidämie beziehungsweise *Candida*-Sepsis entwickeln. Ein wichtiger Faktor ist das Durchbrechen der schützenden Mukosa. Dies kann zum einen traumatisch oder auch durch chirurgische Eingriffe geschehen. Zum anderen ist bei immunsupprimierten Personen wie zum Beispiel HIV-Erkrankten die Mukosa geschwächt und durchlässiger. Dadurch kann es zu einem Erregerübertritt und somit zu einer invasiven Mykose beziehungsweise einer Candidämie bis zur *Candida*-Sepsis kommen (Kullberg und Arendrup 2015). Meistens erfolgen invasive Candidosen endogen, also bei einer schon bestehenden Kolonisation der Haut oder Schleimhaut (Reagan et al. 1990). Die Sterblichkeitsraten einer solchen Infektion sind hoch und werden je nach Studie mit 40 – 60 % beziffert (Jordà-Marcos et al. 2007; Holley et al. 2009; Bassetti et al. 2013; Yang et al. 2013; Colombo et al. 2014; Lortholary et al. 2014; Chakrabarti et al. 2015; Leroy et al. 2016).

Zu den Risikofaktoren an einer invasiven *Candida*-Infektion zu erkranken gehören neben hohem Alter, einer Diabeteserkrankung, einer eingeschränkten Nierenfunktion und chirurgischen Eingriffen auch das Vorliegen einer Pankreatitis, eine Behandlung mit Breitspektrum-Antibiotika, parenterale Ernährung, Dialyse, künstliche Beatmung, ein liegender Zentralvenenkatheter und immunsuppressive Therapie (Blumberg et al. 2001; Jordà-Marcos et al. 2007; Holley et al. 2009; Yang et al. 2013; Chakrabarti et al. 2015).

Es gibt unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit von Candidämien, je nach Land und Studie schwanken sie im Bereich von 5 – 15 %. Eine europäische Studie aus dem Zeitraum von 2006 – 2008 zeigte eine mittlere Wahrscheinlichkeit von neun Candidämien pro 1000 Intensivpatienten. Die Rate schwankte stark von Land zu Land, die höchste Rate innerhalb Europas wurde in Spanien und Italien festgestellt und die niedrigste in Finnland (Klingspor et al. 2015). Eine israelische Studie zwischen 2007 und 2014 über die Inzidenz einer invasiven Candidiasis bei sowohl Intensiv- als auch nicht Intensivpatienten zeigte eine Inzidenz von 0,61 pro 1000 Aufnahmen (Eliakim-Raz et al. 2016). In den USA sind *Candida* der isolierte Erreger in 8 – 10 % aller positiver Blutkulturen. Damit stehen *Candida*-Arten an vierter Stelle der häufigsten Septikämie-Erreger. In Europa sind Blutkulturen im Durchschnitt nur in 2 – 3 % der Fälle positiv für *Candida* (Méan et al. 2008). Jedoch wiesen in der internationalen EPIC-II-Studie 17 % aller positive Blutkulturen einen positiven *Candida*-Befund auf (Kett et al. 2011).

Eine Studie der Charité mit Daten von 682 deutschen Intensivstationen zwischen 2006 und 2011 zeigte, dass 523 von 6666 nosokomialen Septikämien durch *Candida*-Arten verursacht waren. Damit waren *Candida*-Arten der vierthäufigste Erreger für eine nosokomiale Septikämie mit einem prozentualen Anteil von 6,5 % aller auf Intensivstationen erworbenen Septikämien. Von den 523 durch *Candida* verursachten Infektionen waren 381, also rund 73 % durch *C. albicans* verursacht (Meyer et al. 2013).

1.2 Morphologie und Genetik

C. albicans zeichnet sich durch einen hohen Grad an Polymorphismus aus. Der Organismus wächst nicht nur in der „normalen“ weißen Hefeform, sondern kann auch Hyphen oder Pseudohyphen ausbilden. Diese filamentösen Formen sind ein wichtiger Pathogenitätsfaktor, da sie eine Rolle für die Invasion ins Gewebe spielen und dem Organismus helfen, sich an verschiedene Nischen im Wirt anzupassen. Diese alternativen Wachstumsformen werden durch verschiedene Umweltfaktoren wie zum Beispiel pH-Wert, Temperatur und CO₂-Gehalt beeinflusst (Sudbery et al. 2004; Noble et al. 2017).

Im Jahr 2004 konnte erstmals das gesamte Genom des *C. albicans*-Referenzstammes SC5314 sequenziert werden. Das Genom von *C. albicans* besteht aus 16 Mb mit 8 diploiden Chromosomen und, bezogen auf den haploiden Chromosomensatz, 6735 *open reading frames*. Zudem zeigte sich ein hoher Anteil an Heterozygotie, der etwa 4 % des Genoms betraf (Jones et al. 2004; van het Hoog et al. 2007). Des Weiteren zeigt *C. albicans* ein hohes Maß an genetischer Plastizität: Verlust von Heterozygotie (LOH), ganzer oder teilweiser Verlust von Chromosomen, chromosomale Umverteilung und Aneuploidie werden gut toleriert und zeugen von guter Adaptionsfähigkeit des Organismus an seine Umgebung. Oft zeigen sich diese Phänomene als Reaktion auf Umwelteinflüsse wie zum Beispiel Hitze, CO₂-Gehalt oder als Reaktion auf die Behandlung mit Antimykotika (Chibana et al. 2000; Selmecki et al. 2006; Bouchonville et al. 2009; Forche et al. 2009).

1.2.1 Phänotyptransition und Parasex

Im Jahr 1987 wurde eine weitere Phänotyptransition beschrieben, der sogenannte *white opaque switch*. Im Gegensatz zu der „normalen“ weißen, halbrunden Hefeform bilden sich graue (*opaque*), flache Kolonien, welche man durch Phyloxin B anfärben kann (Slutsky et al. 1987). Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass dem sogenannten *Mating-type-like-Locus (MTL)* auf Chromosom 5 eine entscheidende Rolle bei der Transition zukommt. Vom *MTL*-Locus liegen zwei verschiedenen Genotypen vor, *MTL_a* und *MTL_α* genannt. Entsprechend der Diploidität von *C. albicans* ist ein Stamm also entweder homozygot (*MTL_a/MTL_a* oder *MTL_α/MTL_α*) oder heterozygot (*MTL_a/MTL_α*). Die Mehrzahl aller Stämme sind *MTL*-heterozygot (*MTL_a/MTL_α*). Es konnte gezeigt werden, dass nur Stämme, die homozygot im *MTL*-Locus sind, in der Lage sind zur *opaque*-Form zu wechseln, beziehungsweise dass heterozygote Stämme zunächst homogen im *MTL*-Locus werden müssen (Lockhart et al. 2002; Tavanti et al. 2005; Hickman et al. 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass nur bei *MTL*-homozygoten Stämmen, die zuvor zur *opaque*-Form gewechselt sind, eine Art von sexueller Fortpflanzung stattfindet: Zunächst kommt es durch LOH, *crossing over* oder dem Verlust einer Chromosom-5-Kopie mit anschließender Verdoppelung der verbliebenen Kopie zu einer *MTL*-Homozygotie und zum Wechsel von der *white*- zur *opaque*-Form. Anschließend verschmelzen homozygote *opaque*-Stämme von *MTL_a* und *MTL_α*

miteinander, wodurch ein tetraploider Stamm ($MTLa/MTLa/MTL\alpha/MTL\alpha$) entsteht. Dieses Tetraploid wechselt zurück in die *white*-Form und kehrt entweder durch nicht-meiotischen Chromosomenverlust zur ursprünglichen diploiden Form zurück oder verbleibt als Tetraploid (Bennett und Johnson 2003; Wu et al. 2005; Wu et al. 2007). Aufgrund der fehlenden Meiose nennt man diese Form der Fortpflanzung Parasex.

Der *MTL*-Locus konnte zum ersten Mal 1999 beschrieben werden (Hull und Johnson 1999). Die Entdeckung, dass *C. albicans* sich nicht nur klonal vermehrt, sondern auch eine Art von Fortpflanzung stattfindet, gelang kurz darauf im Jahr 2000 (Hull et al. 2000; Magee und Magee 2000). Im Weiteren konnte beschrieben werden, dass der *white opaque switch* durch den Transkriptionsfaktor *Wor1* gesteuert wird. Dieser wird bei *MTL*-heterozygoten Stämmen wechselseitig unterdrückt, was erklärt, warum die homozygote Variante Voraussetzung für den *white opaque switch* ist (Huang et al. 2006; Srikantha et al. 2006; Zordan et al. 2006).

Es kommt beim parasexuellen Zyklus nicht zur Meiose, dennoch zeigt sich durch dieses Geschehen eine große genetische Variabilität. Der *white opaque switch* und das Abfließen von Parasex tritt vor allem unter Umweltstress wie zum Beispiel Temperaturveränderung, Änderungen des CO_2 -Gehaltes oder oxidativem Stress auf. Vermutlich ist also die durch den Parasex vorkommende erhöhte genetische Variabilität (im Gegensatz zur „klassischen“, klonalen Vermehrung) ein weiterer Faktor, um die Überlebenswahrscheinlichkeit des Organismus zu erhöhen und um sich an unterschiedliche Lebensbedingungen anzupassen (Forche et al. 2008; Berman und Hadany 2012). Jedoch zeigten verschiedene epidemiologische Studien, dass der primäre Vermehrungsmodus dennoch klonal erfolgt und Parasex ein eher seltenes Ereignis ist (Pujol et al. 1993; Gräser et al. 1996).

Die *opaque*-Zellen können die Produktion von Biofilm von weißen *Candida*-Zellen fördern, wenn diese den gegenteiligen homozygoten *MTL*-Genotyp zeigen. Die Produktion von Biofilm ist ein großer Virulenzfaktor von *C. albicans*, da er sich zum Beispiel auf Kathetern oder künstlichen Herzklappen bilden kann und so die Behandlung erschwert (Daniels et al. 2006; Nobile und Johnson 2015).

1.3 Typisierung von *C. albicans*

Um Aussagen über die Epidemiologie und Untergruppen von *C.-albicans*-Stämmen zu machen, gibt es schon lange Bemühungen, unterschiedliche Stämme zu typisieren und in Gruppen einzuteilen. Hierzu wurden zunächst Methoden der phänotypischen Einteilung genutzt. Seit der weiten Verbreitung von Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Sequenzierungsmethoden geht der Trend des molekularen Typisierens zum direkten Vergleichen von bestimmten DNA-Sequenzen. Zu den neueren Methoden, welche verschiedene Genom-Polymorphismen identifizieren, gehören *microsatellite length polymorphisms* (MLP) und *multi locus sequence typing* (MLST) (Sampaio et al. 2005; Odds und Jacobsen 2008). Durch die Anwendung dieser Methoden kann *C. albicans* in verschiedene

Untergruppen, Kladen genannt, eingeteilt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Kladen, die durch *Ca3-fingerprinting* und MLST eingeteilt werden, nahezu deckungsgleich sind. Somit können Aussagen über die Epidemiologie von *C. albicans*, die durch *Ca3-fingerprinting* gewonnen wurden, auf MLST-Kladen übertragen werden (Robles et al. 2004; Chowdhary et al. 2006). Der Vorteil dieser Methoden ist, dass sie im Vergleich zu phänotypischen Methoden objektiv und maschinenablesbar sind. Auch die durch MLP eingeteilten Kladen weisen eine gute Übereinstimmung mit den MLST-Kladen auf (Garcia-Hermoso et al. 2007).

1.3.1 MLST

MLST ist eine weitverbreitete und etablierte Methode zur Typisierung von *Candida*. Zunächst wurde sie zur Typisierung von Bakterien eingesetzt und seit den frühen 2000er Jahren auch für pathogene Pilze verwendet (Maiden et al. 1998; Bougnoux et al. 2002; Tavanti et al. 2003). Die Methode funktioniert wie folgt: Bei der MLST von *C. albicans* werden sieben verschiedene Genloci analysiert: *AAT1a*, *ACC1*, *ADP1*, *MPI1b*, *SYA1*, *VPS13* und *ZWF1b*. Diese Gene sind *housekeeping genes*, werden also immer exprimiert. Die Genloci werden per Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend werden pro Locus 400 – 500 Basenpaare sequenziert. Jeder Sequenzunterschied wird als unterschiedliches Allel gewertet und einer Zahl zugeordnet. Die Kombination dieser Zahlen ergibt einen Sequenztyp (ST). Da *C. albicans* diploid ist, ergibt sich daher eine höhere Variabilität an Sequenztypen, weshalb man auch vom *diploid sequence type* (DST) spricht. Anhand der DST kann man Stämme Kladen zuordnen (Bougnoux et al. 2002; Bougnoux et al. 2003; Tavanti et al. 2003). Im Jahr 2003 wurde ein Konsens formuliert, damit verschiedene Labore die gleichen Genloci benutzen und so die Daten vergleichbar sind (Bougnoux et al. 2003). Ein weiterer Vorteil von MLST ist die öffentlich zugängliche, internationale Datenbank, in der aktuell (Stand 23.03.2023) Daten von 5428 Isolaten hinterlegt sind (*Candida albicans* MLST Home Page) (<https://pubmlst.org/calbicans>). Mit der auf dem Konsens aufgebauten Datenbank können epidemiologische Analysen zur Diversität und Verbreitung von *C. albicans* durchgeführt werden.

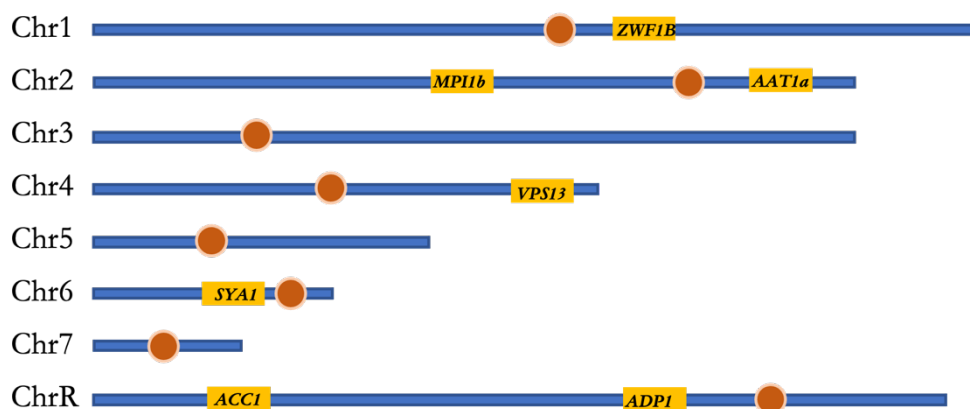


Abbildung 1: Übersicht über die Lage der MLST-Sequenz-Gene. Die Gene werden durch die roten Rechtecke auf den acht Chromosomen von *C. albicans* dargestellt. Die orangefarbene Kreise stellen das Zentromer dar.

1.4 Medikamentöse Therapie und Resistenzen

Zur systemischen Therapie der Candidiasis werden aktuell vier Substanzklassen eingesetzt: Echinocandine (zum Beispiel Caspofungin), Azole (zum Beispiel Fluconazol), Polyene (zum Beispiel Amphotericin B) und Nucleosidanaloga (5-Flucytosin, 5FC). Bei einer *Candida*-Sepsis kann jede Stunde ohne adäquate Therapie im negativen Sinne entscheidend für den Krankheitsverlauf sein und führt zu einer erhöhten Letalität. Aus diesem Grund verfolgen Kliniker einen „hit-hard-and-early“-Therapieansatz (Garey et al. 2006; Cornely et al. 2012). Für die adäquate Therapie ist zum einen die Bestimmung der genauen Spezies wichtig, da dies teilweise schon einen Rückschluss auf die Resistenzlage zulässt (zum Beispiel ist *C. krusei* immer resistent gegen Azole). Zum anderen sollte auch eine Resistenzbestimmung erfolgen, um den empirischen Therapieansatz kritisch zu überprüfen. Im Jahr 2012 kam es in Europa zu einem Paradigmenwechsel in der Initialtherapie der Candidiasis, da nicht mehr Fluconazol, sondern eine Substanz aus der Wirkstoffgruppe der Echinocandine zur Erstwahl wurde (Cornely et al. 2012). Die amerikanischen Fachgesellschaften schlossen sich 2016 an (Pappas et al. 2016). Dennoch bleiben die anderen Substanzklassen wichtige Zweitlinientherapien und sind in vielen Ländern aufgrund der geringeren Kosten beziehungsweise der Verfügbarkeit noch immer von großer Bedeutung (Kneale et al. 2016). Aus Prioritätsgründen wird im Weiteren nur genauer auf 5-Flucytosin (5FC) und die Azole eingegangen.

1.4.1 Bestimmung von Sensibilität und Resistenz

Resistenz ist definiert als Nicht-Sensibilität eines Mikroorganismus gegenüber einer Substanz. Dies wird durch *in-vitro*-Tests festgestellt. Man unterscheidet zwischen primärer (intrinsischer) und sekundärer (erworbener) Resistenz. Die Sensibilität gegenüber einer

Substanz kann über die minimale Hemmkonzentration (MIC) ausgedrückt werden. Das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) definieren für jede *Candida*-Art und jedes Medikament unterschiedliche Grenzwerte der MIC für die Kategorien „Sensibel“, „Sensibel bei erhöhter Dosis“ und „Resistent“. Hierfür werden Verdünnungsreihen benutzt. Der Organismus wird also mit festgelegten Konzentrationsstufen eines Medikamentes inokuliert und anhand des Wachstums die MIC abgelesen (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents Version 10.0, valid from 2020-02-04). Vor 2020 waren die Kategorien als „Sensibel“, „Intermediär Sensibel“ und „Resistent“ festgelegt (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents Version 9.0, valid from 2018-02-12).

1.4.2 5-Flucytosin

5FC ist ein Nukleosid-Analogon der Pyrimidinbase Cytosin. Es wird aufgrund der Resistenzneigung unter Therapie empfohlen, 5FC in Kombination mit Amphotericin B zu geben (Stiller et al. 1983; Barchiesi et al. 2000).

1.4.2.1 Wirkmechanismus

Durch eine Cytosin-Permease gelangt 5FC in die Pilzzelle. In der Zelle wird 5FC durch das Enzym Cytosin-Deaminase (Fcy1) zu 5-Fluorouracil (5FU) desaminiert. Das Enzym Fur1, eine Uracilphosphoribosyltransferase (UPRTase), wandelt das entstandene 5FU zunächst in 5-Fluorouridin-Monophosphat um, welches anschließend zu 5-Fluorouridin-Triphosphat umgewandelt wird. Wenn das 5-Fluorouridin-Triphosphat anstelle von UTP als falscher Baustein in die RNA eingebaut wird, wird hierdurch die pilzliche Proteinbiosynthese gestört. In einem Nebenpfad wird 5FU zu 5-Fluorodeoxyuridin-Monophosphat umgewandelt. Dieses hemmt wiederum die pilzliche Thymidylat-Synthese, und durch den daraus resultierenden Mangel an Desoxy-Thymidin-Monophosphat wird die DNA-Synthese unterbrochen (Polak und Scholer 1975; Polak und Wain 1977; Waldorf und Polak 1983) (Abbildung 2).

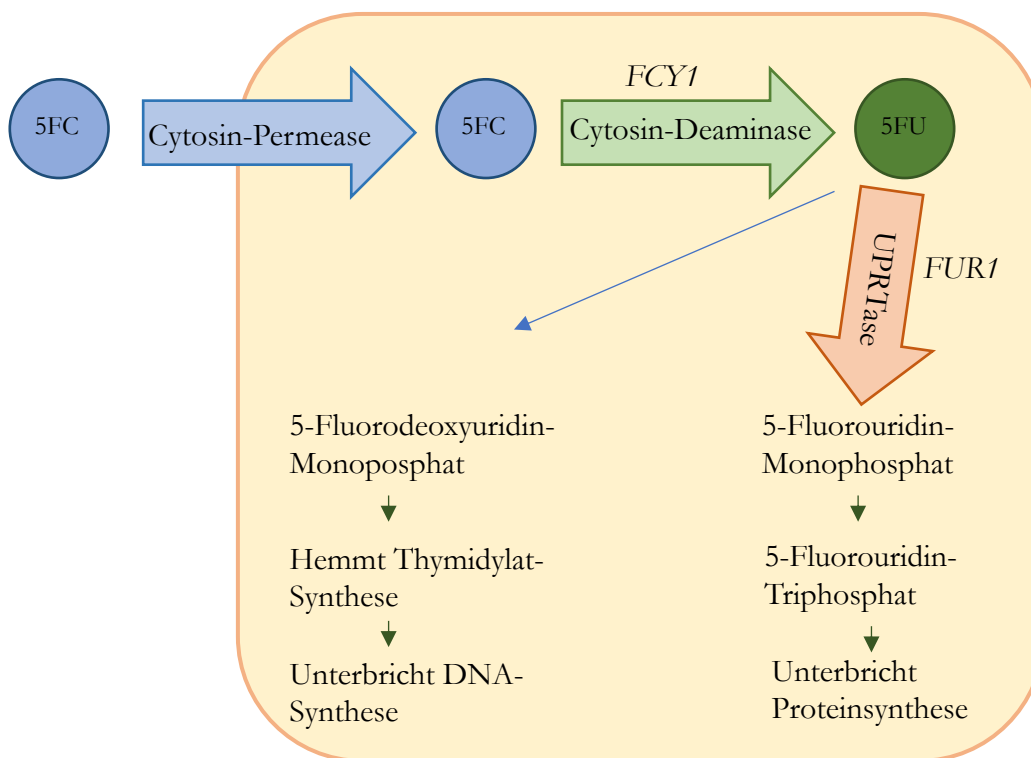


Abbildung 2: Transport von 5FC in die Zelle sowie die Umwandlung und Wirkmechanismus innerhalb der Zelle.

1.4.2.2 Resistenzmechanismus

Bei klinischen Isolaten vor Therapie sind etwa 3 % aller *C.-albicans*-Isolate resistent gegen 5FC (Pfaller et al. 2002). Interessanterweise ist die 5FC-Resistenz in epidemiologischen Studien jedoch nicht gleich auf alle Klade verteilt, sondern ist in der überwiegenden Mehrzahl auf Klade 1 beschränkt. Auch intermediäre Sensibilität in Bezug auf 5FC findet sich vor allem in Klade 1 (Pujol et al. 2004). Der Resistenzmechanismus liegt in einer Punktmutation an Stelle 301 des *FUR1*-Gens. Durch einen Basenaustausch von Cytosin mit Thymin an der Stelle 301 in *FUR1* kommt es an Stelle 101 des Fur1-Proteins zu einem Aminosäureaustausch von Cystein zu Arginin. Bei dem diploiden Organismus zeigten *FUR1*₃₀₁-heterozygote Stämme (also *FUR1*₃₀₁-Genotyp C/T) eine verminderte Sensibilität gegenüber 5FC. Stämme, die den *FUR1*₃₀₁-Genotyp T/T zeigten, waren resistent gegen 5FC. Stämme mit dem nicht mutierten *FUR1*₃₀₁-Genotyp C/C waren sensibel für 5FC (Dodgson et al. 2004). Es ist davon auszugehen, dass die Punktmutation zu einer verminderten Aktivität der UPR1ase führt. Dies hätte eine verminderte Verstoffwechslung von 5FC zur Folge und damit die Resistenz gegen das Antimykotikum (Whelan und Kerridge 1984; Dodgson et al. 2004).

1.4.3 Azole mit Leitsubstanz Fluconazol

Azole sind weitverbreitete Antimykotika und wirken fungistatisch. Von den Azolen ist das Triazol Fluconazol die Leitsubstanz. Triazole besitzen einen Triazolring anstelle des

Imidazolringes, welcher zum einen zu einer erhöhten Affinität zum fungalen Cytochrom P-450 führt, aber auch allgemein die metabolische Stabilität verbessert (Sheehan et al. 1999).

1.4.3.1 Wirkungsweise

Azole wirken durch einen Eingriff in die Ergosterol-Biosynthese, die für den Aufbau der Plasmamembran wichtig ist. Sie blockieren das Enzym Lanosterol-14 α -Demethylase, welches durch das Gen *ERG11* codiert wird. Dies führt einerseits zu einer verminderten Produktion von Ergosterol, welches ein integraler Bestandteil der Plasmamembran ist. Andererseits sammeln sich in der Zelle vermehrt toxische 14- α -Methyl-Sterole an, welche durch Einbau in die fungale Membran diese weiter schwächen (Georgopapadakou und Walsh 1996).

1.4.3.2 Resistenzen

Eine primäre Resistenz von *C. albicans* gegenüber Fluconazol ist selten. In der großangelegten ARTEMIS-Studie, bei der an 142 Standorten aus 41 Ländern Proben gesammelt und untersucht wurden, betrug sie 1,4 % (Pfaller et al. 2010a). Jedoch können die Pilze unter Therapie resistent werden (Sanglard und Odds 2002; Morschhäuser 2016). Eine vorherige Exposition mit Fluconazol scheint ein zusätzlicher Risikofaktor hierfür zu sein (Garnacho-Montero et al. 2010; Slavin et al. 2010).

Es gibt mehrere Wege, wie sich eine Resistenz entwickeln kann: Beim ersten Weg wird die Produktion des Zielenzym erhöht oder das Enzym dahingehend verändert, dass es eine verminderte Bindungskapazität zum Antimykotikum aufweist. Beim zweiten Weg wird das Medikament aus der Zelle transportiert, so dass dieses nicht akkumuliert und die Wirkung vermindert wird. Der dritte Weg besteht darin, dass der toxische Effekt der 14- α -Methyl-Sterole vermindert wird (Kanafani und Perfect 2008). Es ist nicht selten, dass mehrere Resistenzmechanismen in ein und demselben Stamm vorliegen, welches zu hochgradig resistenten Stämmen führt (Pfaller 2012). Auf die einzelnen Resistenzmechanismen wird im Folgenden kurz eingegangen, da in der hier vorliegenden Arbeit zwar nicht direkt mit Azolen gearbeitet wurde, aber ein Genotyp, welcher mit Azolresistenz korreliert, untersucht wurde.

1.4.3.3 *ERG11*-vermittelte Resistenz

Das Zielenzym der Azole ist die Lanosterol-14 α -Demethylase, welche im *ERG11*-Gen kodiert wird. Die Expression von *ERG11* wird wiederum durch den Transkriptionsfaktor Upc2 gesteuert, der durch das *UPC2*-Gen kodiert wird. Für die Resistenz gibt es zwei verschiedene Wege: Zum einen können Mutationen im *ERG11* zu einer verminderten Bindungskapazität von Azolen an ihr Zielenzym führen. Andererseits kann eine gain-of-function(GOF)-Mutation im *UPC2*-Gen zu einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors Upc2 führen. Dies hat eine Hochregulation der Expression von

ERG11 zur Folge und somit eine höhere Produktion Lanosterol-14 α -Demethylase (Dunkel et al. 2008a; Pfaller 2012).

1.4.3.4 Transportsysteme

Bei *C. albicans* sind drei Effluxpumpen bekannt, die verschiedene Wirkstoffe aus der Zelle eliminieren und somit deren Konzentration minimieren. Als relevant für die klinische Resistenz sind die Effluxpumpen der ABC(*ATP binding cassette*)-Transporter Cdr1 und Cdr2 und der MFS(*Major facilitator supergroup*)-Transporter Mdr1 zu nennen. Cdr1 und Cdr2 werden durch die Gene *CDR1* und *CDR2* kodiert, welche durch den Transkriptionsfaktor Tac1 gesteuert werden. Bei einer GOF-Mutation von Tac1 kommt es zu einer Hyperexpression von *CDR1* und *CDR2* und hierdurch zu einem vermehrten Einbau von Cdr1- und Cdr2-Transportern in die Zellwand. Mdr1-Transporter werden durch *MDR1* kodiert, welches durch den Transkriptionsfaktor Mrr1 gesteuert wird. Bei einer GOF-Mutation von *MDR1* kommt es analog zu einem vermehrten Einbau von Mdr1-Transportern in die Zellwand (Albertson et al. 1996; Sanglard et al. 1997; Coste et al. 2006; Coste et al. 2007; Dunkel et al. 2008b). Mdr1-Transporter scheinen spezifisch für Fluconazol zu sein, während Cdr1- und Cdr2-Transporter auch in der Resistenz-Vermittlung für andere Azole eine Rolle spielen (Kanafani und Perfect 2008).

1.4.3.5 *ERG3*-Bypass

Durch die durch Azole vermittelte Hemmung der Lanosterol-14 α -Demethylase wird Lanosterol zu giftigen 14- α -Methyl-Sterolen umgebaut. Dieser Prozess wird durch das Enzym Delta-Desaturase, welches von *ERG3* kodiert wird, gesteuert. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in *ERG3* diesen Umbau zu toxischen Produkten verhindern und somit den Effekt der Azole vermindern (Kelly et al. 1997).

1.4.3.6 Zusammenhang *MTL*-Locus mit Azolresistenz

Auf dem linken Arm von Chromosom 5 von *C. albicans* befinden sich zwei der am häufigsten betroffenen Gene für Resistenzentwicklung gegen Azole, nämlich *ERG11* und *TAC1*. In unmittelbarer Nachbarschaft von *TAC1*, nämlich nur 14 kb entfernt, befindet sich der *MTL*-Locus. LOH in einem mutierten (und damit resistenzinduzierenden) Allel verstärkt die Medikamentenresistenz, da dies zu einem homozygoten Vorliegen des mutierten Allels führt (Sasse et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Fluconazol LOH induziert (Forche et al. 2011). Die GOF-Mutation des *TAC1*-Gens und das Wildtyp-*TAC1*-Gen sind kodominant. Um ein hohes Maß an Azolresistenz zu exprimieren, muss die *TAC1*-Mutation also homozygot vorliegen. In Einklang hiermit konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen von einem mutiertem *TAC1*-Gen LOH des Chromosom 5 induziert. LOH geht häufig mit mitotischer Rekombination und Chromosomenverlust einher, und betrifft daher mehrere Genloci. LOH im *TAC1*-Gen korreliert also mit LOH im *MTL* und gegebenenfalls auch mit LOH im *ERG11* (Coste et al. 2006; Coste et al. 2007). Passend dazu haben frühere

Studien auch eine starke Korrelation von Azolresistenz mit *MTL*-Homozygotie beschrieben (Rustad et al. 2002). Aus dem Genotyp des *MTL*-Locus kann also zu einem gewissen Grad auf den Azolresistenzstatus geschlossen werden.

1.5 Matrix-assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung-Flugzeitanalyse-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

Mit der MALDI-TOF MS steht seit dem Aufkommen kommerzieller erhältlicher Systeme zu Beginn der 2010er Jahre eine wertvolle Methode der Speziesbestimmung in der klinischen Mikrobiologie zur Verfügung. Sie ist schnell, kostengünstig, einfach bedienbar und zeigt sich mit diesen Eigenschaften konventionellen biochemischen Methoden auch in der Genauigkeit überlegen (Seng et al. 2009; Seng et al. 2010). Diese Methode ist nicht nur für die Analyse von Bakterien, sondern auch bei humanpathogenen Pilze wie zum Beispiel Hefen vorteilhaft (van Veen et al. 2010; Bader et al. 2011).

1.5.1 Funktionsweise

Die Funktionsweise gliedert sich in drei Teile: Die Probenpräparation, die Massenspektrometrie mit Flugzeit(TOF)-Messung und anschließend die visuelle Aufbereitung der Daten in Spektren und der Speziesbestimmung mittels Abgleich mit einer Spektren-Datenbank. Wichtig für das Verständnis ist, dass bei dieser Methode keine genetischen Sequenzen, sondern Molekülmassen analysiert werden, die in der Regel Proteine repräsentieren.

1.5.1.1 Probenpräparation

Das zu analysierende Material wird zumeist zunächst auf Agarplatten gezüchtet, es können aber auch Flüssigkulturen verwendet werden. In einigen Fällen ist es möglich, Körperflüssigkeiten wie Liquor, Blut oder Urin direkt zu benutzen. Im Falle der intakten-Zell-Massenspektrometrie (ICMS), auch Schmierpräparation genannt, werden intakte Zellen auf den Analyseträger aufgetragen und die Probe mit einer Matrixlösung überdeckt. Diese Matrix lysiert zunächst die Zellen und setzt die Zellproteine frei. Als Matrix werden Substanzen wie α -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure (HCCA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DBH) oder Sinapinsäure (SA) gewählt. Durch das Überlagern der Probe mit der Matrix wird diese beim Trocknen kokkristallisiert und in die Matrix eingebettet. Matrixsubstanzen absorbieren Energie in einem hohen Maß und dienen zum Ionisieren der Probe.

Diese Präparationsmethode ist für viele Bakterien und einige Hefen ausreichend. Für Bakterien und Pilze, für die zum Beispiel aufgrund einer robusteren Zellwand diese Methode keine ausreichend qualitativen Ergebnisse erzielt, kommen verschiedene Alternativprotokolle zur Probenvorbereitung zum Einsatz.

Auch bei Hefen zeigt eine Extraktionsmethode häufig noch bessere Spektren. Hierbei wird die Probe zunächst mit Ethanol gewaschen und anschließend die Zellwand mittels Ameisensäure und Acetonitril penetriert (Cassagne et al. 2013; Normand et al. 2020).

Mykobakterien erfordern aufgrund ihrer robusten Zellwand-Beschaffenheit und ihrer hohen Pathogenität ein komplexeres Vorgehen. Für diese Pathogene konnte eine Methode entwickelt werden, in der die Erreger im ersten Schritt inaktiviert werden. Im nächsten Schritt wird die Zellwand durch mechanische Mittel, nämlich das Hinzufügen von Glasperlen und dem anschließenden Mischen in einem Vortexgerät mechanisch penetriert. Anschließend wird analog zur Extraktionsmethode mit Acetonitril und Ameisensäure die Probe weiter prozessiert (El Khéchine et al. 2011).

Auch bei Schimmelpilzen zeigt sich die Schmierpräparation aufgrund der robusten Beschaffenheit als nicht ausreichend. Durch die Anwendung eines Protokolls, bei dem die Zellwand durch Zirkonia-Silicium-Perlen und mechanisches Mixen im Vortex-Gerät angegriffen wird, konnte hier eine Verbesserung der Spektrenqualität erreicht werden (Lau et al. 2013). Auch bei *Penicillium*-Stämmen, bei denen die ICMS keine Spektren in ausreichender Qualität produziert, konnte ein Protokoll mit Trifluoressigsäure, Acetonitril und wiederum der mechanischen Zellwandzerstörung mit Zirkoniumperlen zu einer signifikanten Verbesserung der Spektrenqualität führen (Hettick et al. 2008b).

1.5.1.2 Massenspektrometrie mit TOF-Messung

Die vorbereitete Probe wird mit einem gepulsten Laser beschossen und verdampft. Die Matrix absorbiert dabei Laserenergie und macht sie dadurch den Molekülen der Probe zugänglich, welche sich durch diese Energieübertragung aus der Matrix als Ionen lösen (Desorption). Anschließend werden die Ionen im Massenspektrometer über ein elektrisches Feld beschleunigt und treffen auf dem Analysator auf. Ihre Flugzeit wird detektiert. Die Ionen haben eine spezifische Masse, welche in Dalton angegeben wird. Diese Masse hat einen Einfluss auf die Flugzeit, da schwere Ionen langsamer beschleunigen als leichte Ionen.

1.5.1.3 Visuelle Aufbereitung und Speziesbestimmung durch Datenbankabgleich

Die visuelle Darstellung der Analyten erfolgt in Spektren, wobei die x-Achse den Masse-Ladungs-Quotient (m/z) darstellt und die y-Achse die Anzahl der Ereignisse darstellt. Man erhält also ein Spektrum mit unterschiedlichen Signalspitzen („Peaks“). Dieses stellt einen Teil des Proteoms dar, das für gewöhnlich im Bereich von 2 – 20 kDa liegt. Das Spektrum mit den verschiedenen Peaks ist, ähnlich einem Fingerabdruck, hochspezifisch für eine Spezies. Durch Vergleich mit den verschiedenen Spektren der Datenbank kann zumeist eine Identifikation auf Spezieslevel gelingen. Es gibt verschiedene kommerzielle MALDI-TOF-MS-Systeme auf dem Markt. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete System ist der MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Bei dem genannten System wird das Ergebnis einer Analyse mit einem sogenannten *log score* versehen, der als Marker für die

Ergebnisqualität steht. In der klinischen Routine zeigen *log scores* zwischen 1.700 und 1.999 eine Identifikation auf dem Genuslevel (also zum Beispiel *Candida*) an. Bei *log scores* ab 2.000 liegt definitionsgemäß eine Identifikation auf dem Spezieslevel vor (also zum Beispiel *C. albicans*).

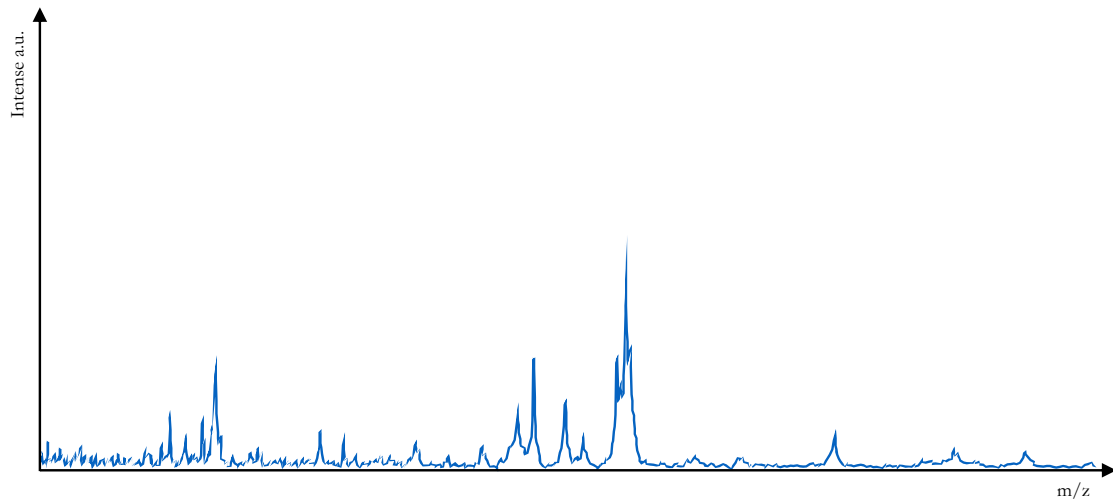


Abbildung 3: MALDI-TOF-MS-Spektrum von *C. albicans*

1.5.2 Klinische Bakteriologie

MALDI-TOF MS ist ein weitreichend eingesetztes Mittel zur Diagnostik in der klinischen Bakteriologie. Da zumeist eine Schmierpräparation ausreichend ist, ist die Prozedur einfach, schnell und kosteneffektiv. Abgesehen davon gibt es viele Studien die zeigen dass MALDI-TOF MS bspw. in Bezug auf die Diagnose von positiven Blutkulturen in Hinblick auf Schnelligkeit und Genauigkeit den konventionellen Methoden ebenbürtig oder sogar überlegen ist (La Scola und Raoult 2009; Stevenson et al. 2010; Haigh et al. 2013).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel im Fall einer bakteriellen Meningitis auch ein Direktnachweis der Bakterien aus dem Liquor gelingen kann, ohne die Bakterien vorher noch auf einem Medium kultivieren zu müssen (Segawa et al. 2014).

Analog dazu konnte gezeigt werden, dass mittels MALDI-TOF MS der Direktnachweis von Bakterien aus Urin gelingt (Ferreira et al. 2010; Köhling et al. 2012).

1.5.2.1 Detektion von Antibiotika-Resistenzen in Bakterien

Für die Detektion von Antibiotika-Resistenzen in Bakterien mittels MALDI-TOF MS liegen weitreichende Studien vor, zum Beispiel zur Detektion von Vancomycin-resistenten Enterokokken (Griffin et al. 2012; Nakano et al. 2014; Wang et al. 2014), zur Unterscheidung von Methicillin-resistenten-Staphylococcus-aureus(MRSA)-Stämmen (Wolters et al. 2011; Josten et al. 2014) und zur Detektion von Carbapenemase-Produktion von *Bacteroides fragilis*

(Johansson et al. 2014), Enterobacteriaceae und *Pseudomonas aeruginosa* (Hoyos-Mallecot et al. 2014).

Bei Marker-Peak-Assays wird anhand von bestimmten Markerpeaks auf Resistenz beziehungsweise Suszeptibilität geschlossen. Es können einzelne Peaks, ein Cluster an Peaks oder ein ganzes Spektrum zum Vergleich herangezogen werden.

Bei *Staphylococcus-aureus*-Stämmen konnte gezeigt werden, dass ein bestimmter Peak bei 2415 m/z mit der Resistenz gegen Methicillin einhergeht. Das heißt, dass Stämme mit diesem Peak MRSA waren. Die Peakidentität konnte mittels RNA-Antisense ermittelt werden und zeigte, dass der Peak mit der Expression von PSM-mec korrelierte, welches ein kleines, mit Methicillinresistenz assoziiertes Peptid ist (Josten et al. 2014).

Bei Enterokokken ist die Vancomycinresistenz ein wichtiger Pathogenitätsfaktor (*vanA*- oder *vanB*-positiv). Es konnte gezeigt werden, dass es in MALDI-Spektren einen Cluster von fünf Peaks gibt, welcher *vanB*-positive von *vanB*-negativen Stämmen unterscheidet (Griffin et al. 2012). Analog dazu konnte gezeigt werden, dass es in den MALDI-Spektren fünf andere Peaks gibt, anhand derer sich wiederum *vanA*-positive und *vanA*-negative Stämme unterscheiden lassen (Nakano et al. 2014).

Bei *Klebsiella-pneumoniae*-Stämmen konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein eines Peaks bei 11109 m/z mit dem Vorhandensein des *bla_{KPC}*-Gens korreliert, welches die *Klebsiella-pneumoniae*-Carbapenemase kodiert. Diese Carbapenemase vermittelt ein hohes Maß an Carbapenem-Resistenz (Lau et al. 2014).

Eine andere Methode stellen Assays dar, die Antibiotika-Alterationen wie Hydrolyse oder Decarboxilierung als Unterscheidungsmerkmal nutzen. Beta-Laktam-Antibiotika werden durch Hydrolyse unwirksam gemacht. Bei diesem Prozess wird der Beta-Laktam-Ring geöffnet und ein H₂O-Molekül angehängt. Das Produkt ist instabil und wird spontan decarboxiliert. Durch diese Prozesse verändert sich die molekulare Masse: Das Anhängen von Wasser addiert 18 Da, die Decarboxilierung verringert sie um 44 Da. Es resultiert also ein Nettomassenverlust von 26 Da. Diese Veränderung in der Masse kann man sich zunutze machen, in dem man ein MALDI-Spektrum eines Antibiotikums mit dem Spektrum nach Inokulation mit einer Bakteriensuspension vergleicht (Sparbier et al. 2012).

Burckhardt et al. zeigten, dass Ertapenem, ein Carbapenem-Antibiotikum, normalerweise vier Peaks in dem untersuchten Abschnitt von 440 – 530 m/z im MALDI-Spektrum aufweist. Nach Inokulation mit carbapenemasetragenden Bakterien verschwanden drei von vier Peaks. Nach Inokulation mit nicht-carbapenemasetragenden Bakterien blieben alle vier Peaks erhalten (Burckhardt und Zimmermann 2011).

Ein weiteres Assay nutzt eine Peakverschiebung durch Inkorporation von C₁₃. Bei dieser Methode werden unterschiedliche Nährböden genutzt, diese unterscheiden sich in den enthaltenen Kohlenstoffmolekülen (C₁₂ respektive C₁₃). Es wird untersucht, ob die Bakterien in Anwesenheit eines Antibiotikums noch wachsen, dieses würde zur Aufnahme von C₁₃

führen und das Spektrum verändern, da C_{13} schwerer ist als C_{12} (also eine höhere m/z aufweisen) (Demirev et al. 2013).

Das *MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay* (MBT-ASTRA) ist eine weitere verwendete Methode. Lange et al. analysierten das relative Wachstum von *Klebsiella pneumoniae*-Stämmen nach einstündiger Inokulation mit Meropenem. Davon ausgehend, dass resistente Stämme wachsen, würden sie eine höhere Peakintensität als sensible Stämme exprimieren. Die Spektren wurden gegen einen inneren Standard als Breakpoint quantifiziert (Lange et al. 2014).

1.5.2.2 Typisierung von Bakterien

Für die weitere Subspezifizierung von Bakterien ist die Analyse von 16S-rDNA derzeit der Goldstandard. Jedoch konnte gezeigt werden, dass MALDI-TOF MS auch in diesem Bereich ein wertvolles Mittel ist. Gerade in einer Ausbruchssituation ist die Unterscheidung zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies wichtig. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass mit MALDI-TOF MS nicht nur unterschiedliche *Listeria*-Arten sicher identifiziert werden können, sondern auch für *Listeria monocytogenes* verschiedene Stammescluster anhand charakteristischer Peaks differenziert werden können (Barbuddhe et al. 2008). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass bei der Differenzierung von *Legionella pneumophila*-Stämmen MALDI-TOF MS gleichwertige Ergebnisse wie die *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) erzielt (Fujinami et al. 2011). Im Falle eines großen Shigatoxinproduzierenden *Escherichia coli*-Ausbruchs 2011 in Norddeutschland konnte gezeigt werden, dass die Ausbruchsstämme mittels zweier spezifischer Peaks sicher durch MALDI-TOF MS von anderen *Escherichia coli*-Stämmen unterschieden werden können (Christner et al. 2014). Auch im Falle von *Acinetobacter baumannii* konnte gezeigt werden, dass MALDI-TOF MS im Vergleich zur etablierten PCR-Methode die Keime in drei unterschiedliche Gruppen clustert, welche nahezu deckungsgleich mit der Analyse durch die PCR-Methode sind (Mencacci et al. 2013). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass anhand bestimmter Markerpeaks das typhusverursachende Serovar von *Salmonella typhus*-Bakterien gegenüber anderen nicht-typhusverursachenden *Salmonella typhi* unterschieden werden kann (Kuhns et al. 2012). Einen neuen Ansatz konnte 2015 von Zautner et al. beschrieben werden, die MSPP-Methode. Hierbei macht man sich die Tatsache zu Nutzen, dass Allelunterschiede bei der Untersuchung im Massenspektrometer in verschiedenen Massen und somit in unterscheidbaren Biomarkerpeaks resultieren. Anhand dieser Methode konnten *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, und *Campylobacter fetus*, sowie *Clostridioles difficile* weiter subtypisiert und gruppiert werden (Zautner et al. 2015).

1.5.3 Klinische Mykologie

Konventionelle Methoden zur Bestimmung von pathogenen Pilzen sind zeitraubend und benötigen erfahrenes Personal. Seit der ersten Anwendung an Pilzen zur Analyse von *Saccharomyces cerevisiae* im Jahre 2001 (Amiri-Eliasi und Fenselau 2001) spielt die MALDI-TOF

MS inzwischen in der klinischen Mykologie eine zunehmend größere Rolle und hat sich hier als schnelle und zuverlässige Methode etabliert (Marklein et al. 2009; Bader et al. 2011). Mit MALDI-TOF MS ist es im Gegensatz zu konventionellen biochemischen Methoden auch möglich, eng verwandte Spezies wie *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* und *C. orthopsilosis* zu unterscheiden (Quiles-Melero et al. 2012). Darüber hinaus ist es gelungen, aus positiven Blutkulturen mittels MALDI-TOF MS einen direkten Erregernachweis zu erzielen (Spanu et al. 2012; Yaman et al. 2012).

1.5.3.1 Detektion von Resistenzen in Pilzen

Die Detektion von Resistenzen mittels MALDI-TOF MS in humanpathogenen Pilzen ist aufgrund der großen Varianz an Mechanismen und dem allgemein komplexeren Aufbau von Pilzen im Gegensatz zu Bakterien erschwert. Einige Pilze haben eine intrinsisch verminderte Suszeptibilität oder vollständige Resistenz gegen Azole (*C. glabrata* und *C. krusei*) oder Echinocandine (*C. parapsilosis*), so dass bereits eine schnelle und korrekte Identifizierung der *Candida*-Art einen Hinweis auf die Resistenzlage ermöglicht (Bader 2013).

Die Inokulation einer Spezies mit einem Antimykotikum würde deren Wachstum hemmen und somit zu einer verminderten Proteinkonzentration führen. Die Spektren von sensiblen Stämmen würden daher eine verminderte Signalintensität (Peakhöhe) aufweisen. Unter dieser Annahme wurde 2009 eine Methode für *C. albicans* und Fluconazol entwickelt (Marinach et al. 2009). Die *C.-albicans*-Stämme wurden hierbei in verschiedenen Fluconazol-Konzentrationen 15 Stunden lang inkubiert. Der Breakpoint wurde als *minimal profile change concentration* (MPCC) benannt. Er liegt bei der minimalen Konzentration des Antibiotikums, bei der eine Veränderung im MALDI-TOF-MS-Spektrum auftritt. Er wird mittels statistischer Methoden erhoben, indem Peakintensitäten von verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen mit den beiden Extremspektren (also Maximalkonzentration, welche für *C. albicans* bei 128 µg/ml Fluconazol liegt und Nullkonzentration) verglichen und analysiert werden. Die MPCC liegt bei derjenigen Konzentration, bei der die Korrelation mit dem Maximalspektrum höher ist als mit dem Nullspektrum. In der Studie lag die so abgelesene MPCC nicht mehr als eine Verdünnungsstufe entfernt von der zuvor bestimmten MIC.

De Carolis et al. konnten 2012 diese Methode durch eine composite-correlation-index(CCI)-Matrix, die mittels der MALDI-Biotyper-Software ermittelt wird, weiter quantifizieren und objektivieren. In der hier beschriebenen Studie geschah dies für verschiedene *Candida*- und *Aspergillus*-Arten und Caspofungin bei Inokulationszeiten von 15 Stunden. Die Resultate zeigten, dass die MPCC-Werte mit der MIC übereinstimmten (De Carolis et al. 2012).

Die Methode wurde 2013 weiterentwickelt. Die CCI-Matrix konnte weiter vereinfacht werden, es wurden nur noch drei Konzentrationen getestet (statt einer Verdünnungsreihe): Nullkonzentration, Breakpointkonzentration und Maximalkonzentration. Die Inokulationszeit mit Caspofungin konnte von 15 auf drei Stunden gesenkt werden. In dieser

Studie wurde nur *C. albicans* getestet. Die Übereinstimmung mit der MIC lag bei 98,4 % (Vella et al. 2013).

In einer anderen Studie wurde versucht, dass für Bakterien entwickelte MBT-ASTRA auf *C. albicans* und *C. glabrata* anzuwenden. Bei der Methode wird die Peakintensität eines Stammes nach Inokulation mit einem Antimykotikum als Maß des Wachstums interpretiert. Die Intensität würde bei Sensibilität niedriger und bei Resistenz höher liegen. In der Studie wurde die Caspofungin-Sensibilität untersucht. Für *C. albicans* lag die Übereinstimmung des mit etablierten Methoden gewonnenen Resistenzstatus bei 100 %, bei *C. glabrata* bei 80 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bisher bei Pilzen im Gegensatz zu Bakterien nicht gelungen ist, einen oder mehrere Peaks zu identifizieren, die mit Medikamentenresistenz in Zusammenhang stehen. Ein Grund hierfür könnte zumindest bei *C. albicans* an die Proteinmassen sein. Diese liegen beispielsweise beim Hauptmechanismen der Azolresistenz bei 62 kDa (Erg11), 170 kDa (Cdr1) und 62 kDa (Mdr1). Damit liegen diese deutlich außerhalb der normalen MALDI-TOF-MS-Detektionsrange von 2-20 kDa (Bader 2013).

1.5.3.2 Subtypisierung von Pilzspezies

Im Jahr 2008 konnten Qian et al. zeigen, dass sich die MALDI-Spektren von vier *C.-albicans*-Stämmen unterschieden: Drei von ihnen zeigten das gleiche Peakmuster, der vierte Stamm zeigte jedoch noch zusätzliche Peaks und konnte anhand dieser visuell von den anderen Stämmen unterschieden werden (Qian et al. 2008). Hiermit konnte zumindest im Kleinen gezeigt werden, dass Typisierung mittels MALDI-TOF MS für *C. albicans* möglich zu sein scheint.

Wie bereits in Abschnitt 1.5 erwähnt, existiert für unterschiedliche Bakterien wie z.B. *Campylobacter jejunii* die Möglichkeit, anhand von Peakverschiebungen weiterhin innerhalb einer Spezies zu subtypisieren (Zautner et al. 2015). Diese Methode könnte sich auch bei eventuell darstellbaren Peakverschiebungen bei pilzlichen Massenspektren als nützlich erweisen.

1.6 Fragestellung

Systemische Candidosen sind wichtige Krankheiten, die insbesondere Intensivpatienten oder anderweitig immunsupprimierte Patientengruppen betreffen und hier Mortalitätsraten bis zu 60 % aufweisen. *C. albicans* ist weiterhin Spitzenreiter der auslösenden fungalen Pathogene. Die Typisierung von *Candida* erfolgt mittels genetischer Methoden wie MLST, auch findet sich bei den MLST-Kladen ein Zusammenhang zur 5FC-Resistenz. Darüber hinaus gibt es eine Assoziation zwischen *MTL*-Locus und Fluconazol-Resistenz. MALDI-TOF MS ist eine etablierte, schnelle, kostengünstige und effektive Methode der Speziesbestimmung für *Candida*-Arten.

Bakterien können mittels MALDI-TOF MS anhand von Peakunterschieden auch über das Spezieslevel hinaus typisiert werden, was insbesondere in Ausbruchssituationen nützlich ist. Außerdem kann anhand bestimmter Peaks auf den Resistenzstatus geschlossen werden. Bei *C. albicans* ist zwar eine Speziesbestimmung sehr zuverlässig möglich, jedoch ist unklar ob die Spektren Peakunterschiede aufweisen, anhand derer auf Stammlevel typisiert oder auf Eigenschaften, wie zum Beispiel den Resistenzstatus geschlossen werden kann.

Das Ziel der Arbeit war es daher, zu überprüfen, ob es möglich sei, vom MALDI-Spektrum ausgehend *C.-albicans*-Stämme zu typisieren und ob es möglich sei auf den Resistenzstatus gegenüber 5FC beziehungsweise indirekt auf den Resistenzstatus gegenüber Fluconazol zu schließen.

1. Ist es möglich durch Variationen der Extraktionsmethode eine Verbesserung der Spektrenqualität zu erreichen, so dass Peakunterschiede sichtbar werden?
2. Ist es möglich, mit einer zusätzlichen mechanischen Zerstörung der Zellhülle in Anlehnung an Protokolle für *Aspergillus* oder Mykobakterien Spektren von hoher Qualität zu erzeugen, die Peakunterschiede sichtbar machen?
3. Wenn es gelingt, Peakunterschiede sichtbar zu machen: gibt es einen Zusammenhang zur MLST-Klade, zum *FUR1*₃₀₁-Genotyp oder zum *MTL*-Genotyp?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *C.-albicans*-Stammsammlung

Die verwendeten *C.-albicans*-Stämme kommen aus der hauseigenen Stammsammlung und wurden bei -70 °C gelagert. Die Stämme wurden auf kommerziellen Sabouraud-Agar-Platten ausgestrichen und für 24 Stunden bei 30 °C kultiviert. Es wurden insgesamt 90 Stämme inklusive des Referenzstammes SC5314 benutzt. Alle Stämme waren bereits zuvor durch MLST typisiert worden (Bader, persönliche Kommunikation).

2.1.2 Puffer und Medien

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Puffer und Medien

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Sabouraud-Agar-Platten mit Glucose, Chloramphenicol und Gentamycin	Sabouraud-Agar-Platten mit Glucose, Chloramphenicol und Gentamycin	Oxoid™ Germany GmbH, Wesel, Deutschland
Cryobank Stocks	Gefrierlösung	Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland
Acetonitrile LC-MS Chromasolv®	Acetonitril	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
ReagentPlus® 99 %	Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
α -cyano-4-hydroxycinnamic acid	HCCA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
ROTIPURAN® 99,8 %	Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aqua bidest (Bidest)	Doppelt destilliertes Wasser (Bidest)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2,5-dihydroxybenzoic acid	2,5-DHB	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Roti®agarose	Agarose Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trichloressigsäure	Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rekombinantes Humaninsulin	Rekombinantes Humaninsulin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Midori Green Advance	DNA-Farbstoff	NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder 0,5µl/µl	Gelelektrophorese-Längenstandard	Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland
50x TAE-Puffer	50 mM EDTA-Dinatrium-Salz, 2 M Tris, 1 M Essigsäure, H ₂ O	Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>taq</i> -Polymerase (5U/µl)		Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland

DNA Gel Loading Dye 6x	Färbepuffer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formic acid Rotipuran® 98 %	Ameisensäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glasperlen, Durchmesser 0,5 mm	Glasperlen, Durchmesser 0,5 mm	BioSpec Products, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MSP 96 polished steel target	Stahlträger für MALDI-TOF MS	Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
Nucleospin®Gel and Clean-up Kit	Aufbereitungsset PCR-Produkte	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
PCR grade nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10mM	Desoxyribonucleosid-triphosphate	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
PCR reaction buffer + Mg (10x)	PCR-Puffer mit Magnesium	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
1 % (w/v) bacto yeast extract, 2 % (w/v) bacto peptone, 2 % (w/v) Glucose in Bidest	YPD-Medium	
Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Bacto™ Yeast Extract	Hefeextrakt	Becton Dickinson and Company, Le Pont-de-Claix, Frankreich
Bacto™ Peptone Extract	Bacto™ Peptone Extract	Becton Dickinson and Company, Le Pont-de-Claix, Frankreich
Glucose	Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ROTI®Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol 25:24:1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TE-Puffer 10x		Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland
RNase	Ribonukleinase	QIAGEN, Venlo, Niederlande

2.1.3 Lösungen

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Lösungen

Lösung	Inhaltsstoffe
Lysis-Puffer (DNA-Extraktion)	100 mM Tris-HCl (pH=8), 50 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS
HCCA-Matrix (10 mg/ml HCCA)	HCCA in 50 % (v/v) Acetonitril und 0,125 % TFA
DHB-Matrix (40 mg/ml DHB)	DHB in 70 % Acetonitril und 0,1 % TFA

2.1.4 Primer

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Primer

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Erwartete Fragmentgröße
<i>FUR1</i>	Vorwärts	GGAGCATCTCGCAACCTGAT	1003 bp
	Rückwärts	TGGCAGGGTTGTCGACTTTT	
<i>MTLa</i>	Vorwärts	CATACCCAAACTCTTATTTGGG	674 bp
	Rückwärts	CACCTTCAACCTCCTCGTTT'TTCC	

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')	
<i>MTLα</i>	Vorwärts	AATCTTCATGGCTATTTCAGCACCT	1012 bp
	Rückwärts	AATATACTAGGTATAAGGATACTTCAA	

2.1.5 Laborausstattung

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Laborausstattung

Material	Hersteller
Eppendorf-Tubes 1,5 ml und 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schraubverschluss-Tubes 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Einmal-Handschuhe	Kimberly-Clark Corporation, Irving, USA
Pipetten 0,5-10 μ l; 10-200 μ l; 100-1000 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 0,01 ml; 0,2 ml; 1 ml	StarLab GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich
Glaspipetten 2 ml; 5 ml; 10 ml	HBG Henneberg-Sander GmbH, Giessen-Lützellinden, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, USA
Sterile Einmal-Impfösen, 10 μ l	Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich

2.1.6 Geräte

Tabelle 6: Übersicht über verwendete Geräte

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Centrifuge 5417R	Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FastPrep® FP120	Fastprep-Maschine	Qbiogene Inc, Illkirch, Frankreich
MALDI-TOF MS	Massenspektrometer	Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
T100™ Thermal Cycler	PCR-Thermocycler	BIO-RAD, Hercules, USA
Nanodrop 2000c	Nanodrop-Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
EPS-301	Gelelektrophorese-Apparat	Amersham pharmacia biotech, Little Chalfont, UK
McFarland-DEN1	McFarland-Densitometer	Biosan, Riga, Lettland
Genius3	Vortexer	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Universal Hood II	Transilluminator	BIO-RAD, Hercules, USA
ThermoMixer C	Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heratherm® Inkubator	Brutschrank 30 °C	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion und Normierung

Für die PCR-Analysen wurde DNA von frischen, über Nacht gewachsenen Pilzplatten extrahiert und isoliert. Ein Schraubdeckel-Gefäß mit einem Fassungsvermögen von 2 ml wurde mit 0,3 g Glasperlen und 200 µl Lysis-Puffer befüllt. In diesem wurde Pilzmaterial in der Größe einer Impföse suspendiert. Danach wurde unter dem Abzug 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl-Mix (25:24:1) hinzugefügt. Die Probe wurde in der Fastprep-Maschine zweimal für 20 s auf Stufe 5 durchmischt. Danach wurden 200 µl TE-Puffer hinzugefügt. Nach einer Zentrifugierung von 5 min bei 12000 rpm wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 1 ml Ethanol in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und geschüttelt. Durch die Zugabe von Ethanol und dem Verbleiben der Probe bei -20 °C für 30 min wurde die Probe gefällt. Anschließend wurde die Probe erneut bei 12000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das verbleibende Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer und 3 µl RNase (10 mg/ml) suspendiert und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der erneuten Zentrifugierung für 5 min bei 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das verbleibende Pellet nach dem Trocknen bei Raumtemperatur in 50 µl TE-Puffer suspendiert. Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop-Photometers gemessen und durch Verdünnung mit Bidest ddH₂O auf 50 pg/ml normiert.

2.2.2 PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung von *FUR1*

Zunächst erfolgte die Herstellung des Mastermixes, der alle Reagenzien außer der DNA enthielt (Tabelle 2). Die PCR wurde nach dem in Tabelle 7 beschriebenen Mastermix vorbereitet. Die PCR wurde mittels Thermalcyclers nach dem in Tabelle 8 beschriebenen Programm durchgeführt. Für die Gelelektrophorese wurden 1,5-prozentige Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Dem Gel wurde beim Zubereiten 6 µl Midori-Green als Färbung hinzugefügt. Zur weiteren Vorbereitung wurde jeweils 8 µl einer Probe mit 2 µl 6xLoading Dye gemischt und diese anschließend in die Geltaschen pipettiert. In die erste Geltasche wurden 10 µl des 100bp-Längenstandards pipettiert. Die Gelelektrophorese lief für 45 min bei einer Spannung von 100 V. Danach wurde das Gel unter einem Transilluminator gelegt, um die Ergebnisse der Gelelektrophorese zu dokumentieren.

Bei einer gelungenen Gelelektrophorese, welche ein PCR-Produkt für *FUR1* anzeigte, wurden die PCR-Produkte nach Anleitung mit dem „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit“ (Macherey-Nagel) aufbereitet. Hierfür wurden jeweils 25 µl des PCR-Produktes mit 50 µl NTI-Bindungs-Puffer gemischt. In einem Sammelröhrchen wurde eine Säule platziert und die Mischung über die Säule laufen gelassen. Durch die Zentrifugierung für 30 s bei 11000 rpm wurde die DNA gebunden und in der Membran gesammelt. Die übrig gebliebene

Flüssigkeit wurde verworfen. Danach wurden 700 µl NT3-Waschpuffer hinzugefügt und erneut bei 11000 rpm für 30 s zentrifugiert und die übrig gebliebene Flüssigkeit ebenfalls verworfen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt. Um die Membran zu trocknen, wurde das Gefäß mit der Säule 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und darauf 15 µl NE-Elutionspuffer pipettiert. Danach inkubierte die Probe für 1 min bei Raumtemperatur und wurde anschließend für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Die so aufgereinigten PCR-Amplifikate wurden zum Sequenzieren an die Firma SEQLAB (Hannah-Vogt-Straße-1, 37085 Göttingen) gegeben. Für die Berechnung der erwartete Fragmentlängen der PCR-Produkte wurde das Primer-Blast-Tool des National Center for Biotechnology Information der U.S. National Library of Medicine benutzt (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabelle 7: Mastermix für die FURI-PCR

Komponente	Menge	Endkonzentration
Primer Vorwärts 100 µM	0,1 µl	0,4 µM
Primer Rückwärts 100 µM	0,1 µl	0,4 µM
10x Puffer	2,5 µl	1x
dNTPs 10 mM	0,5 µl	200 µM
Taq 5 U/µl	0,1 µl	0,5 U/25 µl
H ₂ O	20,6 µl	
DNA 50 ng/µl	1 µl	50 ng/25 µl

Tabelle 8: PCR-Programm für die FURI-PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit
1 (1x)	94 °C	5 min
2 (35x)	94 °C (Denaturierung)	30 s
	59 °C (Annealing)	30 s
	72 °C (Elongation)	2 min
3 (1x)	72 °C	7 min

2.2.3 PCR und Gelelektrophorese von *MTLa* und *MTLα*

Die isolierte DNA wurde mittels des in Tabelle 9 geschildertem Mastermixes für die PCR vorbereitet. Die PCR wurde mittels Thermalcyclers nach dem in Tabelle 10 beschriebenen Programm durchgeführt. Vor dem Gießen der verwendeten 1,5-prozentigen Agarosegele wurde diesen 6 µl Midori-Green hinzugefügt. Die Geltaschen wurden jeweils mit einem Gemisch aus 8 µl Probe und 2 µl Loading Dye befüllt. In die erste Geltasche wurden 10 µl eines geeigneten Längenstandards pipettiert. Die Gelelektrophorese lief für 45 min bei einer

Spannung von 100 V. Danach wurde das Gel unter einen Transilluminator gelegt, um die Ergebnisse der Gelelektrophorese abzulesen.

Tabelle 9: Mastermix für die MTL-PCR

Komponente	Menge	Endkonzentration
Primer Vorwärts 100 μM	0,5 μl	2 μM
Primer Rückwärts 100 μM	0,5 μl	2 μM
10x Puffer	2,5 μl	1x
dNTPs 10 mM	0,6 μl	240 μM
Taq 5 U/ μl	0,5 μl	2,5 U/25 μl
H ₂ O	19,4 μl	
DNA 50 ng/ μl	1 μl	50 ng/25 μl

Tabelle 10: PCR-Programm für die MTL-PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit
1 (1x)	95 °C	10 min
2 (40x)	94 °C (Denaturierung)	1 min
	42 °C (Annealing)	2 min
	72 °C (Elongation)	3 min
3 (1x)	68 °C	10 min

2.3 MALDI-TOF MS

2.3.1 Matrixlösung mit Insulin

Um einen Markerpeak zur internen Kalibrierung der Spektren festzulegen, wurde die Matrix mit rekombinantem Humaninsulin als Kalibrator versetzt. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen: HCCA wurde nach Herstellerangaben in einer Lösung aus 50 % Acetonitril, 47,5 % Wasser und 2,5 % TFA aufgelöst. Die Konzentration der so hergestellten Lösung betrug 10 mg HCCA/ml. Im nächsten Schritt wurde das Humaninsulin zu 10 pg/ μl hinzugefügt. Zur genauen Bestimmung der Masse des Kalibrierungspeaks wurde das Humaninsulin mit dem Biotyper Test Standard (BTS, Bruker Daltonics) gemischt. Im daraus produzierten Spektrum zeigte sich der Peak für Insulin bei 5806 m/z.

2.3.2 Extraktionsmethode

Für diesen Versuch wurde die von der Firma Bruker Daltonics empfohlene Extraktionsmethode verwendet. Hierfür wurden 300 μl Wasser in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gefüllt und mit Pilzmaterial in der Größe einer 10 μl Impföse von einer Agarplatte versetzt und gut suspendiert. Es wurden 900 μl Ethanol hinzugefügt und durch Vortexen

gut gemischt. Anschließend wurde die Probe für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm wurde der restliche Überstand abpipetiert und das Zellpellet für 10 min bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Es wurden 50 µl 70-prozentige Ameisensäure hinzugefügt und durch Pipettieren das Pellet hierin suspendiert. Danach wurde die Probe mit 50 µl Acetonitril versetzt und vorsichtig gemischt. Nach erneuter Zentrifugierung von 2 min bei 14000 rpm wurde vom Überstand 1 µl auf das MALDI-Target pipettiert und dort trocknen gelassen. Sobald die Probe getrocknet war, wurde diese mit 1 µl HCCA-Matrix bedeckt. Nachdem alle Spots getrocknet waren, konnte das Target ausgelesen werden.

2.3.3 Variationen der Extraktionsmethode

Bei dem Vergleich von Flüssig- und Festkulturen wurden die Stämme zum einen auf Sabauroud-Agarplatten ausgestrichen und zum anderen in YPD-Flüssigkultur angelegt. Beide Kulturen wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Von den Flüssigkulturen wurde jeweils 1 ml abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen und danach bei 14000 rpm zwei Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet mit 1 ml Bidest versetzt und durch Pipettierung gemischt. Danach wurde erneut bei 14000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Der Waschschrift mit Bidest wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden 700 µl des Überstandes abpipetiert, so dass sich die Probe in 300 µl Bidest befand. Anschließend konnte weiter nach Extraktionsprotokoll verfahren werden.

Für den Mengenvergleich wurde die Probenmenge in 3 ml Bidest gelöst und die Probe mittels eines McFarland-Gerätes auf 6, 7 und 8 McFarland-Standardseinheiten normiert. Von der Zellsuspension wurden 300 µl in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen und weiter nach Extraktionsmethode verfahren.

Zur Variation der Säurekonzentrationen wurde 100-prozentige Ameisensäure entsprechend der gewünschten Konzentration mit Bidest verdünnt, so dass Ameisensäure-Konzentrationen von 25 %, 40 %, 50 %, 60 % und 75 % zur Verfügung standen. Diese wurden anstelle der 70-prozentigen Ameisensäure im Extraktionsprotokoll verwendet.

Bei den Versuchen mit TCA wurde abweichend vom Extraktionsprotokoll zu Anfang eine Lösung aus 150 µl Bidest, 450 µl Ethanol und 600 µl 40-prozentiger TCA in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß hergestellt. In dieser wurde im nächsten Schritt Pilzmaterial in der Größe einer 10µl Impföse gelöst. Danach wurde die Mischung für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, danach erfolgte eine erneute Zentrifugierung und das Abpipettieren des Überstandes. Das verbleibende Pellet wurde in 1 ml Bidest suspendiert. Danach erfolgten wieder zwei Zyklen Zentrifugierung mit Verwerfung und Abpipettierung des Überstandes. Das verbleibende Pellet wurde analog zum Extraktionsprotokoll weiter prozessiert.

Alternativ zur HCCA-Matrix wurde für einen Versuch die 2,5-DHB-Matrix verwendet. Hierbei wurden die getrockneten Probenspots auf dem MALDI-Target mit 1 μl 2,5-DHB-Matrix überschichtet.

2.3.4 Acetonitril-Fastprep-Methode

Für den Versuch wurden zunächst in einem 2 ml Schraubverschluss-Gefäß 100 μl Bidest und 100 μl Acetonitril gemischt. Dieser Lösung wurde Pilzmaterial in der Größe einer 10 μl Impföse und 0,3 g Glasperlen hinzugefügt. Die Probe wurde für 30 s auf Stufe 5 in der Fastprep-Maschine geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zentrifugierung für 2 min bei 14000 rpm. Vom Überstand wurde 1 μl auf das MALDI-Target pipettiert und nach dem Trocknen mit 1 μl HCCA-Matrix überdeckt. Das Target wurde nach dem Trocknen der Matrix im Massenspektrometer ausgelesen.

2.3.5 Acetonitril-Fastprep-Methode mit Ethanol-Waschschritt

Zunächst wurde Pilzmaterial in der Größe einer 10 μl Impföse in 300 μl Bidest und 900 μl Ethanol suspendiert. Die Suspension wurde bei 14000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 μl Bidest und 100 μl Acetonitril versetzt und gut gemischt. Als nächstes wurden 0,3 g Glasperlen hinzugefügt. Die Probe wurde für 30 s auf Stufe 5 in der Fastprep-Maschine geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zentrifugierung für 2 min bei 14000 rpm. Vom Überstand wurde 1 μl auf das MALDI-Target pipettiert und nach dem Trocknen mit 1 μl HCCA-Matrix überdeckt. Das Target wurde nach dem Trocknen der Matrix im Massenspektrometer ausgelesen.

2.3.6 Datenerhebung und Analysetools

Die Messungen wurden mit dem MALDI BioTyper 3.1 mit der Referenzdatenbank-Version 3.0 an einem Autoflex III Massenspektrometer mit einem 20 Hz Stickstofflaser (Bruker Daltonics) durchgeführt. Hierbei wurden 600 Spektren im *positive linear mode* in einem Masseumfang von 2 – 20 kDa durch das Auto Flex III System in Frequenzen von 100-Schuss-Schritten erhoben und aufsummiert. Die Laserintensität wurde durch die Software FlexControl im vom Hersteller empfohlenen automatischen Modus gelenkt. Vor der Messung wurde das Gerät mit Hilfe des Bruker Test Standards kalibriert. Nur Spektren mit einem *log value* über 2,000 wurden berücksichtigt.

Anhand der Standardeinstellungen des Biotypers konnten *main spectra* (MSP) erstellt werden und dann anhand von Algorithmen einem Ast im Taxonomiebaum zugeteilt werden. Zur Veranschaulichung wurde durch die Programmfunktion *dendrogram clustering* ein Dendrogramm erstellt werden mit den Einstellungen *distance measure = correlation* und *linkage = average*.

Für die weitere Analyse und Vergleich der Spektren wurde das Programm FlexAnalysis von Bruker Daltonics benutzt. Die Spektren wurden zunächst anhand des Insulin-Peaks bei 5806,1 m/z kalibriert. Anschließend wurden durch Benutzung der Standard-Algorithmen die Grundlinie abgezogen (*baseline subtraction*) und die Spektren geglättet (*smoothing*).

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics Client 28.0 durchgeführt. Hierbei wurde die Funktion „Analyze“ -> descriptive statistics -> crosstable genutzt. Hierbei wurden 5 Tests durchgeführt. Als „column“ wurde immer *FUR1*-Genotyp gesetzt. Als „Row“ wurde jeweils „Vorhandensein Peakmuster B“, „Vorhandensein Peakmuster A“, „Vorhandensein Peakmuster AC“, „Vorhandensein Peakmuster BC“ und „Vorhandensein Peakmuster C“ gewählt. Unter „Statistics“ wurde chi-square angewählt. Danach wurde unter dem Reiter „Exact“ der Button „exact“ aktiviert. Das Zeitlimit pro Test wurde auf fünf Minuten begrenzt.

3 Ergebnisse

Für die Analysen wurden insgesamt 90 *C.-albicans*-Stämme miteinander verglichen. 89 der Stämme stammten aus der hauseigenen Stammsammlung und waren bereits via MLST typisiert. Darüber hinaus wurde der Referenzstamm SC5314 verwendet, welcher gemäß MLST-Typisierung der Klade 1 angehört. Die Verteilung auf die Klade 1 ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Verteilung der Klade über die untersuchten Stämme

Klade	Anzahl Stämme
1	36
2	2
3	4
4	18
5	3
6	5
7	2
8	2
9	5
11	8
12	3
S	2

Zunächst wurden Parameter der Extraktionsmethoden variiert, um die Spektrenqualität zu verbessern. Im nächsten Schritt wurde ein neues Extraktionsprotokoll etabliert und die Spektrenunterschiede analysiert. Im letzten Schritt wurde der *FUR1*₃₀₁-Genotyp und der *MTL*-Locus analysiert und die Korrelation zu den MALDI-Spektren bestimmt.

3.1 Extraktionsmethode für alle Stämme

Es wurden nach dem Extraktionsprotokoll gemäß Herstellerangaben von allen 90 Stämmen MALDI-Spektren produziert. Eine Identifikation auf Spezieslevel gelang durchgängig mit einem *log value* größer 2,000, jedoch gab es visuell keine Unterschiede zwischen den Spektren.

3.2 Veränderungen am Extraktionsprotokoll für MALDI-TOF MS

Das Extraktionsprotokoll wurde zunächst in verschiedenen Versuchen wie im Folgenden dargestellt verändert (Tabelle 12). Es sollte (a) überprüft werden, ob die Wahl zwischen Fest- und Flüssigkultur einen Unterschied in der Spektrenqualität erzeugt. Im Extraktionsprotokoll des Herstellers wird darüber hinaus als Mengenangabe „Material in der Größe einer 10 μ l Impföse“ angegeben. Im Hinblick darauf (b) wurde untersucht, ob eine Mengenstandardisierung mittels McFarland-Konzentrationsmessung einen Einfluss auf die Spektren hat. Im nächsten Schritt (c) wurde die Ameisensäure-Konzentration variiert und schließlich (d) im Ethanolwaschschritt zusätzlich Trichloressigsäure hinzugefügt. Im letzten Schritt (e) wurde die Alternativ-Matrix 2,5-DHB statt der Standard-Matrix HCCA verwendet. Für die Versuche wurde eine Stichprobe gewählt (Stämme EU0993, EU1001, EU1002, EU1006 und EU1007).

3.2.1 Vergleich Fest- und Flüssigkultur

Zum Vergleich der Flüssig- und Festkulturen wurden die oben genannten Stämme jeweils in Fest- und Flüssigkultur gezüchtet. Anschließend wurden aus den Kulturen mittels Extraktionsprotokoll MALDI-Spektren gewonnen. Es zeigte sich kein Unterschied im Hinblick auf die Qualität der Spektren. Bei allen gemessenen Spektren konnte eine Bestimmung auf Spezieslevel durchgehend erfolgen. Legte man die Spektren der Festkulturen übereinander zeigten sich keine visuellen Unterschiede. Dies verhielt sich beim Übereinanderlegen der Spektren der Flüssigkulturen genauso.

3.2.2 Variation des Materialeinsatzes

In Variation des Protokolls wurde die verwendete Masse an Pilzmaterial mittels McFarland-Messung normiert (McFarland-Konzentrationen 6, 7 und 8). Aus allen Konzentrationen konnten qualitativ ausreichende Spektren produziert werden. Es zeigten sich, wenn man verschiedene Stämme von jeweils einer McFarland-Konzentration übereinanderlegte, keine visuell sichtbaren Unterschiede.

3.2.3 Variation Ameisensäurekonzentration

Das Extraktionsprotokoll wurde anschließend mit verschiedenen Ameisensäure-Konzentrationen, nämlich 25 %, 40 %, 50 %, 60 % und 75 % durchgeführt, als Variation der Standard-Konzentration von 70 %. Bei einer Ameisensäurekonzentration von 25 % konnten keine Spektren gewonnen werden. Beim Übereinanderlegen der Spektren von den verschiedenen Säurekonzentrationen konnten visuell keine Spektren-Unterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung 4).

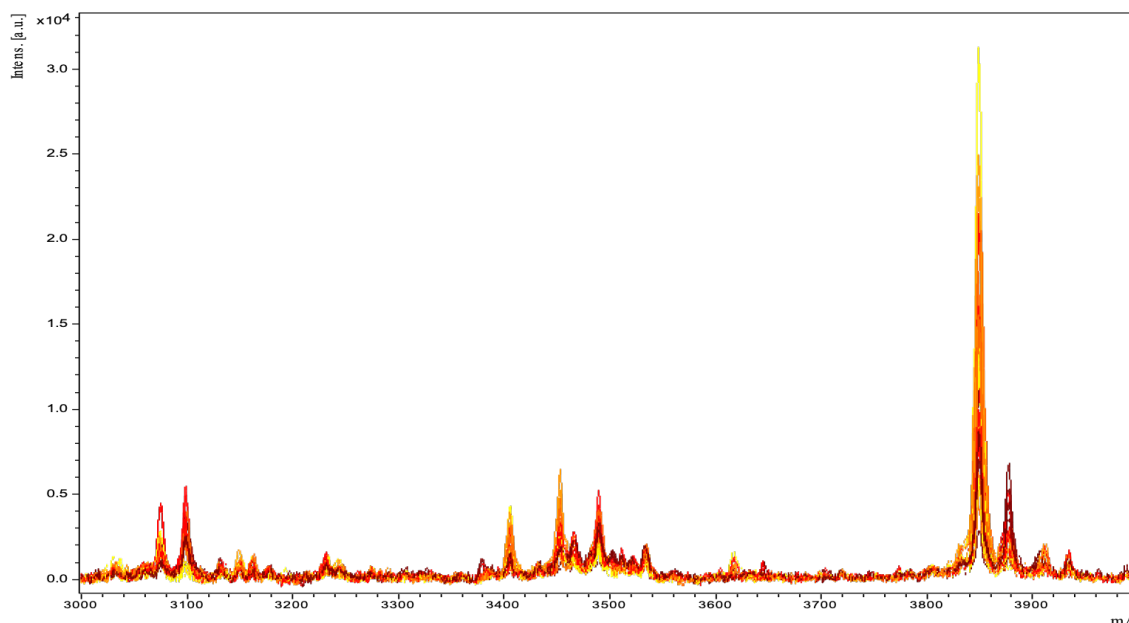


Abbildung 4: Spektren bei Verwendung verschiedener Ameisensäure-Konzentrationen. Die verschiedenen Säurekonzentrationen betragen 40 % (gelb), 50 % (orange), 60 % (hellrot) und 75 % (dunkelrot). Im Beispiel ist exemplarisch der Massebereich von 3 – 4 kDa dargestellt.

3.2.4 Zusatz von TCA im Ethanol-Waschschritt

Im nächsten Versuch wurde beim Ethanol-Waschschritt des Extraktionsprotokolls noch 40-prozentige Trichloressigsäure hinzugefügt, um zu evaluieren, ob es möglich sei, kleinere Proteine auszufällen und damit mehr Peaks zu produzieren. Aus den daraus resultierenden Proben konnten keine Spektren gewonnen werden, somit konnte auch kein Abgleich mit der Datenbank erfolgen.

3.2.5 Variation Matrixsubstanz

Als letzter Versuch wurde das Extraktionsprotokoll befolgt, im letzten Schritt wurde allerdings statt der vorher verwendeten HCCA-Matrix die ebenfalls von Bruker empfohlene 2,5-DHB-Matrix verwendet. Es zeigten sich nur wenige ergiebige Spektren mit deutlich weniger Peaks als mit der HCCA-Matrix. Beim Übereinanderlegen der Spektren zeigte sich kein visuell sichtbarer Unterschied.

Tabelle 12: Variationen am Extraktionsverfahren zur Verbesserung der Spektrenqualität

Veränderung	Ergebnis
Flüssig- und Festkultur im Vergleich	Kein Unterschied in Spektrenqualität
McFarland-Konzentrationen statt „einer Impföse“ bei der Probenmenge	Kein Vorteil gegenüber der Verwendung von „einer Impföse“ Material
Variierende Konzentrationen von Ameisensäure im Extraktionsprotokoll; Verwendete Konzentrationen: 25 %, 40 %, 50 %, 60 % und 75 %	Keine Spektren bei einer Konzentration von 25 % Keine visuellen Unterschiede zwischen den Stämmen bei verschiedenen

	Säurekonzentrationen
Hinzufügen von 40-prozentiger Trichloressigsäure im Ethanol-Waschschritt	Keine Spektren in verwendbarer Qualität
Austausch der HCCA-Matrix mit 2,5-DBH-Matrix	Keine Spektren in verwertbarer Qualität

3.3 Etablierung einer neuen Extraktionsmethode (Acetonitril-Fastprep-Methode)

3.3.1 Acetonitril-Fastprep-Methode

Es erfolgte ein neuer Ansatz um die Zellwand der *C.-albicans*-Stämme mechanisch anzugreifen und dadurch die für die Massenspektrometrie benötigten Proteine freizusetzen. Die Lyse der Zellwand erfolgte hier nicht nur durch ein chemisches Agens, sondern durch mechanische Mittel, indem die Probe mit Glasperlen versetzt wurde und anschließend in einer Fastprep-Maschine 30 s mechanisch zerkleinert wurde. Die Probe wurde mit Acetonitril und anschließend, nach dem Trocknen der Probe, mit der HCCA-Matrix überlegt. Die Lyse der Zellwand erfolgte hier auch durch mechanische Mittel, indem die in Acetonitril und Bidest gelöste Probe mit Glasperlen versetzt wurde und anschließend in einer Fastprep-Maschine 30 s geschüttelt wurde. Vom Überstand wurde je 1 μ l auf ein Target pipettiert und nach dem Trocknen der Probe mit der HCCA-Matrix überlegt.

Mit den neu gewonnen Spektren gelang eine Identifikation auf Spezieslevel durchgehend. Zudem zeigten sich im Gegensatz zu den aus der Standard-Extraktionsmethode gewonnenen Spektren drei Peaks im Bereich von 3700 – 3900 m/z, deren Vorhandensein beziehungsweise Nichtvorhandensein sich von Stamm zu Stamm unterschied. Der erste Peak, im weiteren Peak A genannt, befand sich bei 3687 m/z, der zweite Peak, im weiteren Peak B genannt, lag bei 3774 m/z und der dritte Peak, im weiteren Peak C genannt befand sich bei 3802 m/z. Es ergaben sich die folgenden Verteilungsmuster: 1. Nur Peak A vorhanden (Peakmuster A), 2. Nur Peak A und C vorhanden (Peakmuster AC), 3. Nur Peak B vorhanden (Peakmuster B) sowie 4. Nur Peak B und C vorhanden (Peakmuster BC) und nur Peak C vorhanden (Peakmuster C) (Abbildung 5).

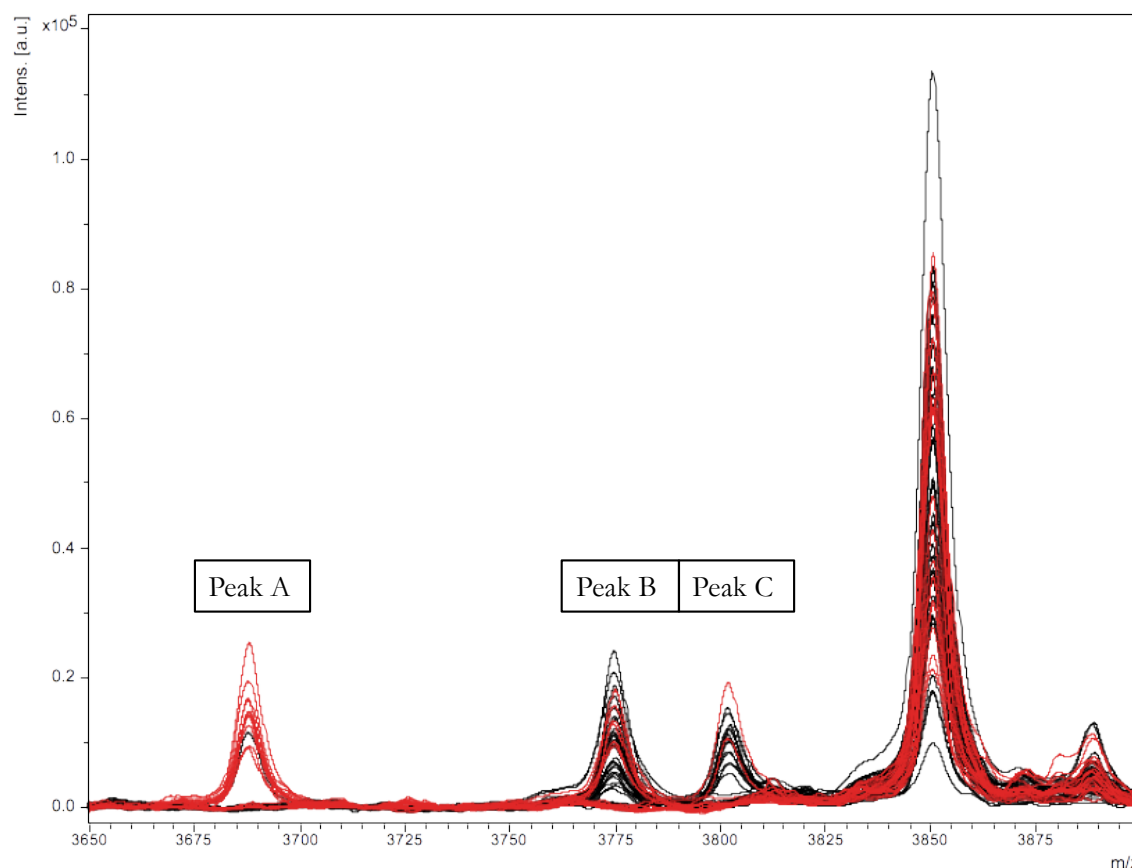


Abbildung 5: Peakunterschiede im MALDI-Spektrum. Die Überlagerung aller Spektren der Stämme von Klade 1 (schwarz) und Klade 4 (rot). Die Massen der Peaks betragen 3687 m/z (Peak A), 3774 m/z (Peak B) und 3802 m/z (Peak C). Man erkennt die Peakmuster A, AC, B, BC und C.

3.3.2 Acetonitril-Fastprep-Methode mit Ethanol-Waschschritt

Im weiteren Fortgang wurde untersucht, ob sich die zuvor beschriebene Acetonitril-Fastprep-Methode durch einen zusätzlichen Ethanol-Waschschritt vor der Mischung in der Fastprep-Maschine noch verbessern ließe. Die Methode zeigte im Vergleich zur Extraktionsmethode bessere Spektren sowohl in Bezug auf Intensität und Quantität der Peaks. Die bei der Acetonitril-Fastprep-Methode dargestellten Masseunterschiede der Signale für verschiedene Stämme im Bereich von 3700 – 3900 m/z konnten auch mit dieser Methode reproduziert werden. Allerdings zeigte sich im Vergleich zur Acetonitril-Fastprep-Methode eine geringere Intensität der Peaks. Eine Identifikation auf Spezieslevel war durchgehend möglich. In einem Methodenvergleich von Extraktionsmethode, Acetonitril-Fastprep-Methode und Acetonitril-Fastprep-Methode mit Ethanol-Waschschritt zeigt sich, dass die Acetonitril-Fastprep-Methode die höchsten Peaks im Bereich 3700 – 4000 m/z zeigt (Abbildung 6)

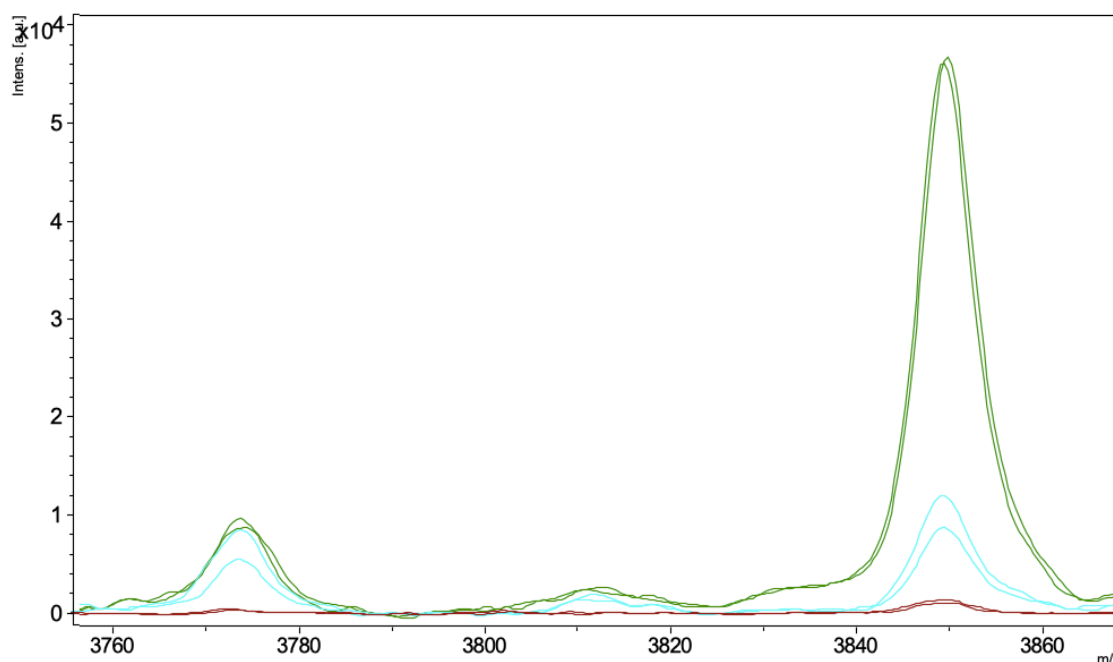


Abbildung 6: Methodenvergleich am Beispiel des Stammes EU1001. Rot: Standard-Extraktionsmethode, grün: Acetonitril-Fastprep-Methode, blau: Acetonitril-Fastprep-Methode mit zusätzlichem Ethanol-Waschschritt. Die Acetonitril-Fastprep-Methode produziert unter gleichen Messbedingungen die intensivsten Signale.

3.3.3 Acetonitril-Fastprep-Methode für alle Stämme und Vergleich mit den MLST-Kladen

Im Weiteren wurden für alle Stämme mit der Acetonitril-Fastprep-Methode Spektren erzeugt und anschließend in Hinblick auf die drei unterschiedlichen Peaks A, B und C verglichen. Es zeigte sich, dass es insgesamt fünf Verteilungsmuster gab (Peakmuster A, Peakmuster AC, Peakmuster B, Peakmuster BC und Peakmuster C, Abbildung 5). Die Peakmuster AB oder ABC kamen in dieser Kohorte nicht vor. Zudem wurden die Peakunterschiede in Abhängigkeit von den Kladen betrachtet. Nur ein Stamm, der nicht Klade 4 angehört, besitzt den Peak A (Stamm EU0923, zugehörig zur Klade 1).

3.3.4 PCR-Analyse und Sequenzierung des *FUR1*-Gens

Für jeden Stamm wurde mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese das *FUR1*-Gen dargestellt (Abbildung 7). Das PCR-Produkt wurde im nächsten Schritt sequenziert. Von den insgesamt 90 Stämmen waren 80 Stämme homozygot für Cytosin (C/C, suszeptibler Wildtyp) und 10 Stämme homozygot für Thymin (T/T, Resistenzvariante). Kein Stamm war heterozygot für Cytosin/Thymin im Locus 301. Die Punktmutation tragenden Stämme gehörten alle der MLST-Klade 1 an.

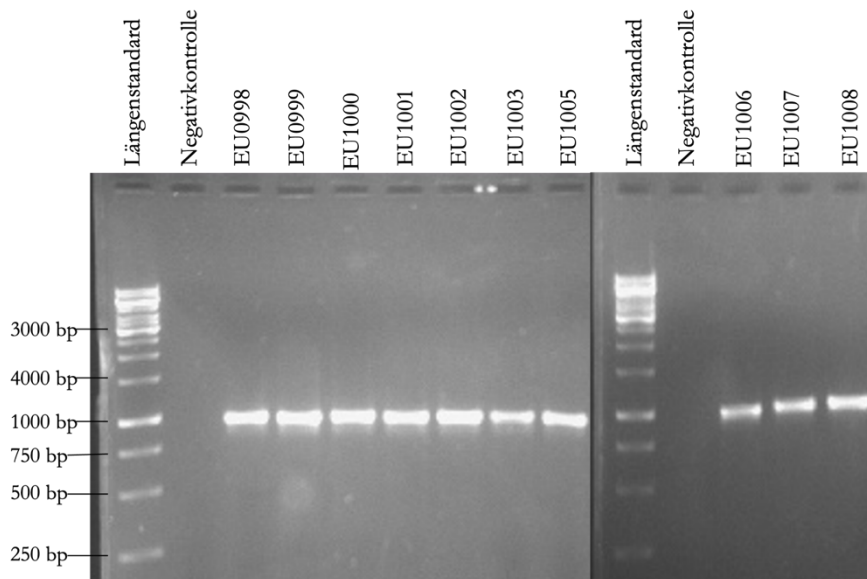


Abbildung 7: Gelelektrophorese der *FUR1*-PCR-Produkte. Die erwartete Fragmentlänge für das *FUR1*-Produkt beträgt 1003 bp.

3.3.5 PCR-Analyse des *MTL*-Locus und Gelelektrophorese

Im Folgenden wurde für alle Stämme eine PCR für den *MTL*-Locus durchgeführt. Für jeden Stamm wurde eine PCR für *MTLa* sowie für *MTL α* durchgeführt und die PCR-Produkte zum Ablesen auf ein Agarosegel aufgetragen. Von allen 90 Stämmen waren 67 im *MTL*-Locus homozygot für *MTLa* (*MTLa/MTLa*), 23 Stämme waren heterozygot (*MTLa/MTL α*). Kein Stamm zeigte die homozygote Variante für *MTL α* (*MTL α /MTL α*).

3.3.6 Ergebnisübersicht

Im Weiteren wurden die mit der Acetonitril-Fastprep-Methode gewonnenen Spektren mit den aus den PCR gewonnenen Ergebnissen verglichen. Hier zeigte sich im Hinblick auf den *FUR1*₃₀₁-Genotyp, dass alle Stämme, die in der Gensequenzierung des *FUR1*-Gens an Position 301 den Genotyp T/T hatten, im Spektrum das Peakmuster B zeigten. In Bezug auf den *MTL*-Genotyp ergab sich keine Korrelation mit dem Peakmuster der MALDI-Spektren.

Tabelle 13: Auflistung der Ergebnisse der *FUR1*₃₀₁-Sequenzierung, *MTL*-Locus-PCR, Markerpeaks aus den durch Acetonitril-Fastprep-Methode gewonnenen MALDI-Spektren und die Zuordnung zur MLST-Klade.

Stamm	MLST-Klade	<i>FUR1</i> ₃₀₁ -Genotyp	MALDI-Peak	<i>MTL</i> -Genotyp
EU0001	2	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0006	2	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0009	12	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0012	1	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0013	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0014	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0022	1	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0047	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0056	11	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0068	4	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0071	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0075	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0077	1	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0108	1	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0109	1	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0110	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0112	9	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0113	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0115	11	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0116	11	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0117	9	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0123	11	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0126	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0128	9	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0130	11	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0133	3	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0134	1	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0136	8	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0174	12	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0177	12	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0364	1	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0365	1	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0488	4	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0490	4	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0491	4	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0494	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0495	1	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0895	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0903	S	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0905	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0923	1	C/C	AC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0924	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0926	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0927	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0931	11	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0934	S	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0936	6	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0937	6	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0959	9	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0962	5	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0967	3	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0968	1	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0969	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0970	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0971	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0972	11	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0973	6	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0974	8	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0975	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0976	4	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0977	7	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0978	6	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0980	1	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0981	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0982	6	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0983	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0984	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0985	5	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0987	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0988	9	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0989	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0990	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0991	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0992	5	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0993	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0994	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0995	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0996	3	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU0997	11	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0998	3	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α
EU0999	4	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU1000	7	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU1001	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU1002	1	T/T	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU1003	1	C/C	B	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU1005	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU1006	1	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU1007	1	C/C	BC	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
EU1008	4	C/C	A	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _a
SC5314	1	C/C	C	<i>MTL</i> _a / <i>MTL</i> _α

3.3.7 Statistische Auswertung

Zur weiteren statistischen Auswertung wurden zunächst Vier-Felder-Tafeln für die Merkmale *FUR1*-Genotyp und die jeweiligen Peakmuster erstellt. Danach wurde für die jeweilige Merkmalskombination ein exakter Test nach Fisher durchgeführt. Hier zeigte sich bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ nur für die Merkmalskombination *FUR1*-Genotyp

und Peakmuster B mit einem p -Wert von $<0,001$ ein signifikantes Ergebnis. Um einen Fehler der ersten Art (Nullhypothese wird verworfen, obwohl sie wahr ist) zu vermeiden wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Das so adjustierte Signifikanzniveau α^* beträgt 1%. Auch nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur bleibt die Korrelation von *FUR1*-Genotyp und Peakmuster B signifikant. Somit kann die Nullhypothese, also dass die Merkmale *FUR1*-Genotyp und Peakmuster B unabhängig seien, abgelehnt werden.

Berechnet man aus der Vier-Felder-Tafel der Merkmale *FUR1*-Genotyp und Peakmuster B die Teststatistik (mit der Definition das Vorliegen Peakmuster B repräsentiere einen positiven Test) so ergibt sich hieraus eine Testsensibilität von 100 %, mit einer Spezifität von 65 %. Darüber hinaus liegt der negativ prädiktive Wert bei 100 % und der positiv prädiktive Wert bei 25 %.

Tabelle 14: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des *FUR1*-Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters B

Genotyp <i>FUR1</i>	Peakmuster B - ja	Peakmuster B - nein	Total
C/C	29	51	80
T/T	10	0	10
Total	39	51	90

Tabelle 15: Statistische Auswertung für die Merkmale *FUR1*-Genotyp und Peakmuster B

Chi-Square Tests						
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Point probability
Pearsons Chi-Square	14.712	1	<.001	<.001	<.001	
Continuity Correction	12.230	1	<.001			
Likelihood Ratio	18.387	1	<.001	<.001	<.001	
Fisher's exact test				<.001	<.001	
Linear-by-Linear Association	14.548	1	<.001	<.001	<.001	<.000
N of Valid class	90					

Tabelle 16: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des *FUR1*-Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters A

Genotyp <i>FUR1</i>	Peakmuster A - ja	Peakmuster A - nein	Total
C/C	14	66	80
T/T	0	10	10
Total	14	76	90

Tabelle 17: Statistische Auswertung für die Merkmale *FUR1*-Genotyp und Peakmuster A

Chi-Square Tests						
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Point probability
Pearsons Chi-Square	2.072	1	.150	.212	.167	
Continuity Correction	.954	1	.329			
Likelihood Ratio	3.604	1	.058	.212	.167	
Fisher's exact test				.351	.167	
Linear-by-Linear Association	2.049	1	.152	.212	.167	.167
N of Valid class	90					

Tabelle 18: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des *FUR1*-Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters AC

Genotyp <i>FUR1</i>	Peakmuster AC – ja	Peakmuster AC – nein	Total
C/C	1	79	80
T/T	0	10	10
Total	1	89	90

Tabelle 19: Statistische Auswertung für die Merkmale *FUR1*-Genotyp und Peakmuster AC

Chi-Square Tests						
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Point probability
Pearsons Chi-Square	2.072	1	.150	.212	.167	
Continuity Correction	.954	1	.329			
Likelihood Ratio	3.604	1	.058	.212	.167	
Fisher's exact test				.351	.167	
Linear-by-Linear Association	2.049	1	.152	.212	.167	.167
N of Valid class	90					

Tabelle 20: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des *FUR1*-Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters BC

Genotyp <i>FUR1</i>	Peakmuster BC – ja	Peakmuster BC – nein	Total
C/C	20	60	80
T/T	0	10	10
Total	20	70	90

Tabelle 21: Statistische Auswertung für die Merkmale *FUR1*-Genotyp und Peakmuster BC

Chi-Square Tests						
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Point probability
Pearsons Chi-Square	3.214	1	.073	.109	.069	
Continuity Correction	1.921	1	.165			
Likelihood Ratio	5.373	1	.020	.076	.069	
Fisher's exact test				.109	.069	
Linear-by-Linear Association	3.179	1	.075	.109	.069	.069
N of Valid class	90					

Tabelle 22: Vier-Felder-Tafel für den Zusammenhang des *FUR1*-Genotyps und dem Vorliegen des Peakmusters C

Genotyp <i>FUR1</i>	Peakmuster C – ja	Peakmuster C – nein	Total
C/C	16	64	80
T/T	0	10	10
Total	16	74	90

Tabelle 23: Statistische Auswertung für die Merkmale *FUR1*-Genotyp und Peakmuster BC

Chi-Square Tests						
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Exact Significance (2-sided)	Point probability
Pearsons Chi-Square	2.432	1	.119	.199	.126	
Continuity Correction	1.257	1	.262			
Likelihood Ratio	4.177	1	.041	.140	.126	
Fisher's exact test				.199	.126	
Linear-by-Linear Association	2.405	1	.121	.199	.126	.126
N of Valid class	90					

Tabelle 24: Zusammenfassung der Merkmalskombinationen (*FUR1*-Genotyp mit Peakmuster) und den resultierenden *p*-Werten

<i>FUR1</i> - Genotyp	Peakmuster					Total
	A	AC	B	BC	C	
C/C	14	1	29	20	16	80
T/T	0	0	10	0	0	10
<i>p</i> -Wert	0,351	1,000	<0,001	0,109	0,199	

Bei Betrachtung der verwandtschaftlichen Nähe der Stämme in dem unten aufgeführten Dendrogrammen (Abbildung 8) zeigt sich kein vollständiges Zusammenclustern der jeweiligen Peakgruppen. Allerdings zeigt sich, dass alle Stämme mit dem Peak A (Peakmuster A und AC) im unteren, hellgrünen Ast zusammenclustern, mit Ausnahme von Stamm EU0970, der sich im roten Ast befindet.

Betrachtet man nun die Stämme mit der Punktmutation T/T, so zeigt sich im Vergleich der MLST-Dendrogramms und des MALDI-Dendrogramms, dass im MLST-Dendrogramm die Stämme mit der T/T-Mutation eine enge verwandtschaftliche Beziehung zeigen und somit

zusammen in einem der Hauptarme des Dendrogramms zu finden sind. Im Gegensatz dazu findet sich im MALDI-Dendrogramm keine nahe verwandtschaftliche Beziehung der mutierten Stämme. Es konnte darüber hinaus keine Kongruenz von den MALDI-Peak-Gruppen mit den MLST-Kladen festgestellt werden.

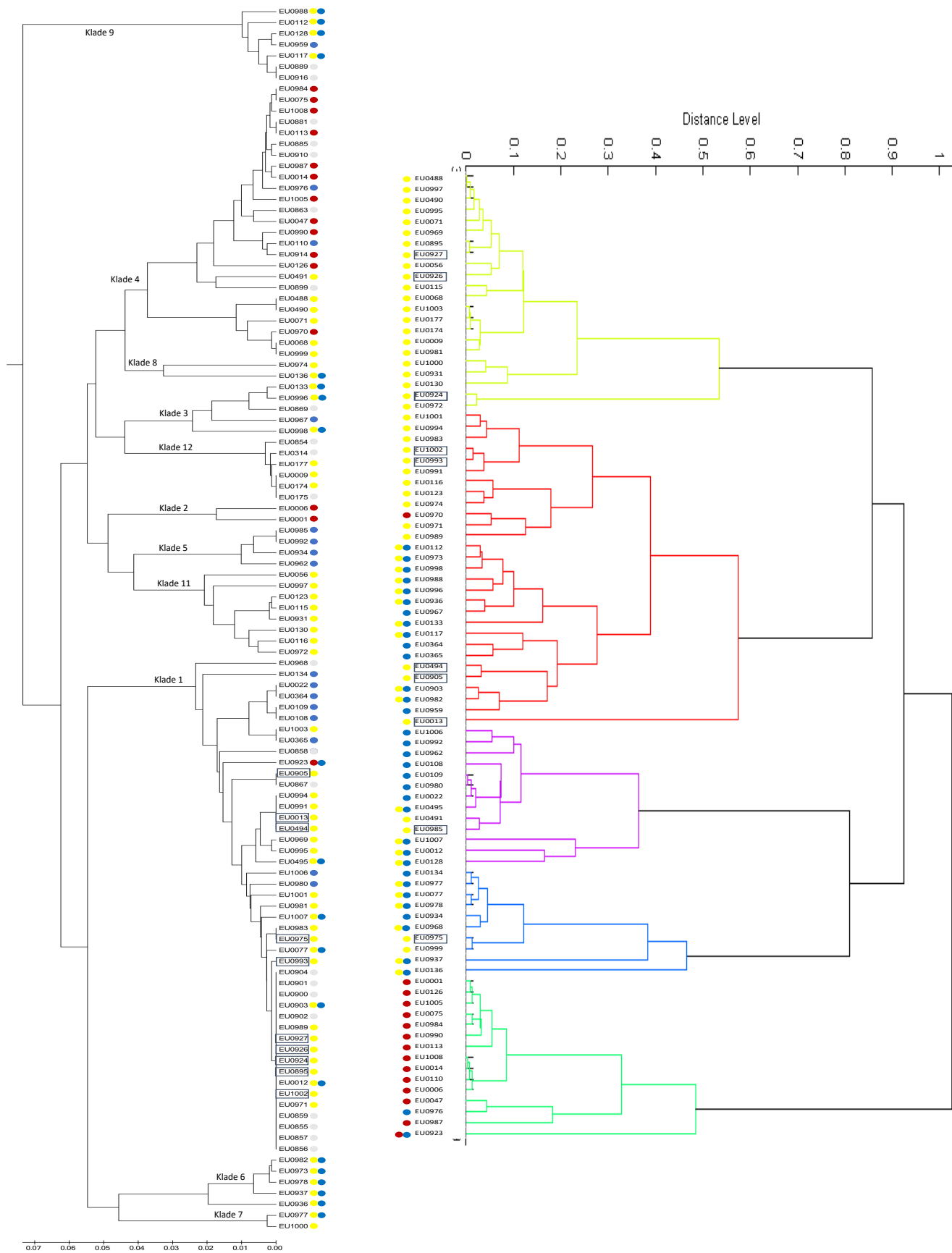


Abbildung 8: Vergleich MLST-Dendrogramm (links) und MALDI-Dendrogramm (rechts). Rot: Peak A, Gelb: Peak B, Blau: Peak C, schwarzer Rahmen: *FUR1*-Genotyp T/T

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es möglich sei, *C. albicans*-Stämme mittels MALDI-TOF MS über das Spezieslevel hinaus zu analysieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mit einem optimierten Extraktionsprotokoll Spektren zu produzieren, die sich in insgesamt drei Peaks unterscheiden. Anhand dieser Peaks konnten die untersuchten Stämme in fünf Gruppen unterteilt werden. Peakgruppe B zeigte hierbei eine Korrelation mit dem Vorliegen der Resistenzvariante des *FUR1*-Genotyps gegen 5-FC. Eine Korrelation mit dem *MTL*-Locus-Genotyp konnte nicht gezeigt werden.

Zunächst wurden alle 90 *C. albicans*-Stämme mittels der vom Hersteller Bruker Daltonics empfohlenen Extraktionsmethode analysiert. Diese Methode beinhaltet die chemische Lyse der Zellwand durch Ameisensäure. Es bestätigte sich, dass mittels dieser Methode eine Speziesidentifikation bei durchgehend guter Validität möglich war. Jedoch zeigten sich keine visuellen Spektren-Unterschiede. Danach wurden verschiedene Schritte der Extraktionsmethode variiert, um zu überprüfen, ob diese Methode noch verbessert werden könnte. Die Variationen führten allerdings nicht zu einer Verbesserung der Spektren. Danach wurde ein neues Protokoll etabliert, welches die mechanische Zerstörung der Zellwand beinhaltete und für alle Stämme angewandt wurde. Mit dieser neuen Methode zeigten sich visuelle Spektren-Unterschiede, anhand derer die verwendeten Stämme in Gruppen eingeteilt werden konnten. Im letzten Schritt wurde der *FUR1*₃₀₁-Genotyp, als Korrelat für das Vorliegen einer 5FC-Resistenz und der *MTL*-Locus-Genotyp als Hinweis auf eine Azolresistenz, ermittelt und die Genotypen mit den Ergebnissen der neuen MALDI-Methode abgeglichen. Zudem wurden die genetischen MLST-Kladen mit der neuen Methode verglichen. Es zeigte sich keine Assoziation der MLST-Kladen oder des *MTL*-Locus-Genotyps zu den neu eingeteilten Gruppen. Jedoch zeigte sich eine starke Korrelation des *FUR1*₃₀₁-Genotyps mit einem bestimmten Peakmuster (Peakmuster B) und der daraus resultierenden Gruppe. Es ist das erste Mal, dass mittels MALDI-TOF MS eine Typisierung von *C. albicans* unterhalb des Spezieslevel erfolgen konnte. Zudem zeigte sich zum ersten Mal, dass die phylogenetische Komponente einer 5FC-Resistenz ein Korrelat im MALDI-Spektrum aufweist.

4.1 Die MALDI-Extraktionsmethode zeigt gute Ergebnisse, jedoch keine visuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Spektren

Die Extraktionsmethode von Bruker Daltonics zeigte durchgehend gute Ergebnisse, eine Speziesidentifikation gelang bei 100 % der Stämme. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da es sich hierbei um eine bewährte und valide Methode zur Probenpräparation handelt. Durch die Ameisensäure wird die Zellhülle angegriffen und der Zellinhalt der Analyse zugänglich gemacht. Im Gegensatz zu Organismen mit einer komplexeren Zellhülle wie zum Beispiel Schimmelpilzen ist die Methode für Hefen sehr gut anwendbar. In den großen

Studien von Goyer et al. und Cassagne et al. gelang den Autoren in Bezug auf Hefen eine Identifikation von 94 % respektive 98 % (Goyer et al. 2012; Cassagne et al. 2013). In Studien, in denen nur *C. albicans* analysiert wurde, liegt die Trefferquote oft bei 100 %. Der visuelle Vergleich durch das Übereinanderlegen von unterschiedlichen Spektren zeigte keine visuellen Unterschiede. Visuelle Unterschiede, wie zum Beispiel die Verschiebung von Peaks oder die Exprimierung von Peaks bei einigen Stämmen jedoch nicht bei anderen, wurde bisher bei *C. albicans* für die Extraktionsmethode nicht beschrieben. Die gute Deckungsgleichheit der Spektren macht es zwar einerseits sehr einfach, den Organismus zu identifizieren. Andererseits lässt sie somit keinen Raum anhand eines so erhobenen Spektrums zwischen verschiedenen Stämmen zu unterscheiden.

Die in diesem Teil der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse decken sich also mit den Beobachtungen großer anderer Studien: Die Extraktionsmethode ist reproduzierbar und führt zu einer guten Speziesidentifikation. Allerdings bestätigt sich, dass die hochgradig kongruenten Peakmuster, die zu der sehr guten Identifikation führen, gleichzeitig bedeuten, dass anhand ihrer nicht unterhalb des Spezieslevels unterschieden werden kann.

4.2 Durch Variationen der Extraktionsmethode kann keine Verbesserung erzielt werden

In dem darauffolgenden Versuch wurde die Extraktionsmethode in verschiedenen Teilschritten variiert und diese Variationen an zehn exemplarischen Stämmen getestet. Durch die Variationen kam es zu keiner signifikanten Qualitätsverbesserung der Spektren. Es zeigten sich darüber hinaus auch keine visuell feststellbaren Peakunterschiede.

Bei der Variation der Ameisensäure-Konzentration gelang erst ab einer Konzentration von 40 % eine Produktion von Spektren. Bei darunterliegenden Säurekonzentrationen konnten keine Spektren produziert werden. Anscheinend führt erst eine Säurekonzentration von mindestens 40 % zu einer ausreichenden Lyse der Zellwand mit Ausschüttung des Zellinhaltes. Es ist zu vermuten, dass die unzureichende Zerstörung der Zellwand nur zu einer Analyse von Oberflächemolekülen führt, die nicht für die Produktion von Spektren ausreichend ist. Im visuellen Vergleich zeigte sich, dass die Spektrenqualität im Schritt von 70-prozentiger auf 75-prozentiger Säurekonzentration wieder abnahm. Die gewonnenen Peaks zeigten also eine verminderte Intensität. In diesem Fall ist es möglich, dass die Säure den Zellinhalt bereits anfang anzugreifen und somit die Spektrenqualität wieder abnahm.

In einer Studie mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass eine Behandlung der Probe mit 25-prozentiger Ameisensäure die besten Ergebnisse erzielte (Amiri-Eliasi und Fenselau 2001). Allerdings stammt diese Beobachtung aus den Anfangszeiten der MALDI-Analyse für Pilze und es erfolgte auch kein maschineller Spektrenabgleich mit einer Datenbank. Zudem ist *Saccharomyces cerevisiae* zwar auch eine Hefe, aber eine andere Spezies und somit sind die Ergebnisse nicht notwendigerweise übertragbar.

Durch den Einsatz von TCA im Ethanol-Waschschritt konnten keine Spektren erzielt werden. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Säure für diesen Schritt zu stark war und damit nicht geeignet war, die Zellwand zu lysieren ohne dabei den Zellinhalt anzugreifen. Wäre die Säure zu schwach gewesen, hätte man zumindest Spektren von niedriger Qualität gesehen, da man auch schon durch Schmierpräparation Spektren erhält.

El Khéchine et al. testeten verschiedene Methoden zur Ausfällung von Proteinen an Mykobakterien, darunter den Zusatz von Trifluoressigsäure. Auch dort zeigte die Verwendung von Ameisensäure die besten Ergebnisse (El Khéchine et al. 2011).

Die Normierung der Probenmasse mittels McFarland-Geräts zeigte ebenfalls keine besseren Ergebnisse als die Verwendung einer eher groben Mengeneinheit „eine Impföse voll“. Solange also eine ausreichend Menge Material für die Analyse zur Verfügung steht, scheint eine große Toleranz zu herrschen. In zwei Studien, die MALDI-TOF MS zur Identifikation von Hefen benutzten, konnte auch dies bestätigt werden. Marklein et al. testeten 250 klinische Hefeisolate und benutzten hierfür „bis zu fünf Kolonien“ an Pilzmaterial. Die Erfolgsrate der Identifikation betrug 92,5 % (Marklein et al. 2009). In der Studie von Goya et al. wurden 335 klinische Hefeisolate getestet und hierbei nur Einzelkolonien für die Probenvorbereitung benutzt. Die Identifikationsrate lag bei 94 % (Goyer et al. 2012).

Auch zwischen Flüssig- und Festkultur konnte kein Unterschied gezeigt werden. Da hier jeweils intakte Zellen gewonnen und dann nach dem gleichen Protokoll verarbeitet werden, ist dies nicht weiter verwunderlich. Die meisten Studien verwenden der Einfachheit halber Fest- statt Flüssigkulturen, denn bei Flüssigkulturen müssen zunächst die Zellen durch mehrfaches Waschen vom Medium befreit werden. Laut Bruker-Daltonics-Protokoll können beide Kulturformate verwendet werden.

Durch die Verwendung von 2,5-DHB-Matrix statt HCCA-Matrix konnten keine Spektren erzielt werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus der Literatur, die auch keine guten Ergebnisse mit DHB-Matrix erzielten. So ergab bei den vergleichenden Versuchen von Amiri-Eliasi und Fenselau an *Saccharomyces cerevisiae* und von Qian et al. an verschiedenen *Candida*-Arten die Verwendung von 2,5-DHB-Matrix allenfalls eine schlechte Spektrenqualität (Amiri-Eliasi und Fenselau 2001; Qian et al. 2008). In beiden Fällen war das Probenkollektiv klein und wurde nicht mit dem Extraktionsprotokoll bearbeitet. Große aktuelle Vergleichsstudien verwenden die HCCA-Matrix und erzielen sehr gute Ergebnisse.

Die Extraktionsmethode ist eine validierte und robuste Methode, dies konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden. Cassagne et al. verglichen in einer Studie vier Probenvorbereitungsmethoden und analysierten 103 Hefeproben von 27 Spezies. Mittels Extraktionsmethode konnten die besten Ergebnisse, nämlich eine Identifikation von 98 % erzielt werden (Cassagne et al. 2013).

Auch in einer großen multizentrischen Vergleichsstudie, in der 1511 Hefeproben, verschiedene Extraktionsmethoden und unterschiedliche Träger betrachtet wurden, zeigte nur die Extraktionsmethode eine durchgehend ausreichende Identifikation der Isolate (Normand et al. 2020).

Es konnte mit dieser Arbeit bestätigt werden, dass die Extraktionsmethode, wie sie von Bruker Daltonics empfohlen wird, nicht durch Variationen der Teilschritte zu verbessern ist.

4.3 Durch eine neue Extraktionsmethode kann das Spektrum so verbessert werden, dass Peakunterschiede sichtbar werden

Mit der Etablierung des neuen Protokolls für die Acetonitril-Fastprep-Methode ist es gelungen, Spektren der *C.-albicans*-Stämme zu produzieren, welche sich im Bereich 3700 – 3900 m/z in drei Peaks unterscheiden, die gemeinsam fünf verschiedene Peakmuster ergeben. Trotz der unterschiedlichen Peaks gelang durchgehend eine gute Identifikation auf Spezieslevel mit *log values* über dem Schwellenwert von 2,000. Im Unterschied zur konventionellen Extraktionsmethode ist die Acetonitril-Fastprep-Methode auch noch zeit- und ressourcensparend. Vermutlich führt die Beimischung der Glasperlen und die anschließende Durchmischung durch Schütteln in der Fastprep-Maschine zu einer mechanischen Zerstörung der Zellhülle. Der freigesetzte Zellinhalt wird nicht mehr durch Säure angegriffen, sondern nur durch das Acetonitril präzipitiert. Die Peaks liegen im Bereich 3700-3900 m/z, sie entsprechen also eher Molekülen mit kleineren Massen. Die mit dieser Methode produzierten Peaks zeichnen sich im Vergleich zur Extraktionsmethode zudem durch eine höhere Intensität aus. Durch Abgleich des Spektrums mit den in der Datenbank hinterlegten Spektren gelingt weiterhin eine Speziesidentifikation. Dies bedeutet, dass trotz der bereits genannten Peakunterschiede immer noch eine ausreichende Deckungsgleichheit mit den Referenzspektren besteht. Auch diese Tatsache ist von Vorteil, da keine neuen Referenzspektren in die Datenbank eingegeben werden müssen. Die Peakidentität konnte nicht eruiert werden. Darüber hinaus ist auch nicht klar, ob die Peaks wirklich neu sind. Es ist auch denkbar, dass die Peaks auch vorher schon da waren, aber aufgrund der mangelnden Intensität nicht über der Nachweisgrenze lagen und im Hintergrundrauschen untergegangen sind.

Anhand der Peaks kann man die untersuchten *C.-albicans*-Stämme in fünf Gruppen nach den Peakmustern einteilen. Es ist also möglich, mit dieser Methode *C.-albicans*-Stämme unterhalb des Spezieslevels zu unterscheiden. Allerdings war es nur in geringem Maße möglich, einen Zusammenhang zu den MLST-Kladen herzustellen. So gehörten alle Stämme, die nur den Peak A exprimierten, zur Klade 4. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da MLST auf genetischen Markern, nämlich der Sequenzierung von *housekeeping genes*, beruht und MALDI TOF MS auf der Analyse des Proteoms.

Auch andere Studien hatten bereits von Erfolgen durch die Verwendung einer Vorbehandlung der Probe mit Perlen berichtet:

Schimmelpilze wie die *Aspergillus*-Arten zeigen aufgrund ihrer widerstandsfähigen Zellwand unter der Extraktionsmethode schlechte Spektren mit nur wenigen Peaks, welche nicht für eine Identifikation ausreichend sind. Hettick et al. arbeiteten mit einem Protokoll mit Zirkonium-Perlen und konnten hierdurch eine größere Peakmenge in den untersuchten *Aspergillus*-Proben darstellen. Die hieraus resultierenden Spektren zeigten im Vergleich zu Spektren aus der Extraktionsmethode vermehrt Peaks, anhand derer zwischen den einzelnen Arten unterschieden werden konnte (Hettick et al. 2008a).

Mit der gleichen Methode konnten Hettick et al. in einer anderen Studie auch zeigen, dass zwischen *Penicillium*-Stämmen unterschieden werden kann. In jener Analyse wurden 12 *Penicillium*-Arten verglichen, und anhand der neuen Spektren konnte zwischen den Arten differenziert werden (Hettick et al. 2008b).

Auch Lau et al. verwendete eine um Zirkonia-Silicium-Perlen erweiterte Methode und konnte eine deutliche Verbesserung der Spektren und der Identifikation von diversen Schimmelpilzen im Vergleich zur Extraktionsmethode erreichen (Lau et al. 2013). Allerdings benutzten Lau et al. auch eine eigens mit dieser Methode etablierte Datenbank, so dass die verbesserte Identifikation nicht weiter verwunderlich ist. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die mechanische Zerstörung der Zellhülle ein entscheidender Vorteil bei der Prozessierung von Schimmelpilzen ist.

Die Identifikation von Mykobakterien ist mit einer normalen Schmierpräparation aufgrund der robusten Zellhülle oft nicht möglich. El Khéchine et al. konnten zeigen, dass ein neues Protokoll mit Glasperlen die Spektren insoweit verbessert, dass eine Differenzierung zwischen verschiedenen Mykobakterien möglich wird (El Khéchine et al. 2011).

Was die Subtypisierung unterhalb des Spezieslevel angeht, ist die Forschung für Bakterien fortgeschritten. So konnte gezeigt werden, dass bei normaler Schmierpräparation schon Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen sichtbar sind. Als Beispiel seien *Hämophilus-influenza*-Spektren genannt, bei denen anhand zweier Biomarkerpeaks der gefährlichere Serotyp B von den anderen Serotypen unterschieden werden kann (Månsson et al. 2015).

Bei der Analyse von 160 *Salmonella-enterica*-Stämmen konnte mittels MALDI-TOF MS zwar eine sehr gute Identifikation auf Spezieslevel gelingen, jedoch konnte zwischen dem wichtigen Serovar typhi und den anderen Serovaren nicht unterschieden werden. Bei der Betrachtung der erstellten Spektren und dem Übereinanderlegen der Spektren fiel allerdings auf, dass es drei Hauptpeaks und einige andere Nebenpeaks gibt, anhand derer das Serovar typhi von anderen Serovaren unterschieden werden kann (Kuhns et al. 2012).

Für Pilze verhält es sich anders. Für eng verwandte Arten wie den *C. parapsilosis*/*-metapsilosis*/*-orthopsilosis*-Komplex gelingt eine Identifikation durch die Extraktionsmethode problemlos (Bader et al. 2011). Hier scheinen also die Spektren der sehr eng verwandten Arten

ausreichend Unterschiede darzustellen, anhand derer sie verlässlich unterschieden werden können.

Darüber hinaus konnten Pulcrano et al. bei der Untersuchung von *C. parapsilosis*-Proben von einer Neugeborenen-Intensivstation in Italien zeigen, dass mittels MALDI-TOF MS und der Extraktionsmethode nicht nur die sichere Identifikation gelang, sondern auch eine Subtypisierung möglich war. Hierfür wurden über vier Jahre insgesamt 19 Proben von *C. parapsilosis* gesammelt und zusammen mit einer Kontrollprobe aus der Stammsammlung analysiert. Die Analyse erfolgte mittels PGFE, MALDI-TOF MS und MLP. Mittels PFGE war eine Unterscheidung der Stämme nicht möglich. Die MLP zeigte eine hohe Diskriminierung und Reproduzierbarkeit. Überraschenderweise zeigte die MALDI-TOF MS nicht nur eine sehr gute Identifikation, sondern konnte anhand der MALDI-Daten auch ein Dendrogramm erstellt werden, welches die Isolate in zwei Gruppen einteilte. Das Dendrogramm teilte die Proben in Jüngere und Ältere ein und zeigte eine gute Übereinstimmung mit dem MLP-Dendrogramm (Pulcrano et al. 2012).

Auch Dhieb et al. untersuchte die Möglichkeit, mit MALDI-TOF MS in der Analyse einen Schritt weiterzugehen. Sie untersuchten ein Kollektiv aus 58 *C. glabrata*-Stämmen. Von dem Probenkollektiv stammten 49 Stämme entweder aus Tunis oder aus Marseille, die restlichen Stämme stammten aus einer Stammsammlung aus unterschiedlichen Orten. Es wurden die Stämme mittels MLP und MALDI-TOF MS (Extraktionsmethode) untersucht. Bei der Untersuchung der Daten zeigte sich, dass die MLP die Stämme statistisch signifikant in zwei große Cluster aufteilte (Tunis und Marseille). Mit der MALDI-TOF MS gelang dies auch. Mehr noch, die Ergebnisse waren deckungsgleich. Somit konnte gezeigt werden, dass mittels MALDI-TOF MS auch nach geographischen Kriterien gruppiert werden kann. Ebenso wie bei der zuvor genannten Studie mit *C. parapsilosis* waren MLP- und MALDI-TOF-MS-Ergebnisse deckungsgleich (Dhieb et al. 2015b)

In einer zweiten Untersuchung hatte die gleiche Arbeitsgruppe *C. albicans*-Stämme mit der Extraktionsmethode und MALDI-TOF MS sowie MLP analysiert. Insgesamt wurden 102 Stämme aus Marseille und Tunis verwendet. Während die Speziesidentifikation mit MALDI-TOF MS sehr gute Ergebnisse erzielte, konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den MLP-Kladen und den MALDI-Ergebnissen hergestellt werden. Darüber hinaus konnte aus den MALDI-Ergebnissen auch keine Differenzierung nach geographischer Lage (Tunis oder Marseille) getroffen werden (Dhieb et al. 2015a). Wie diese beiden Studien zeigen, können selbst bei so eng verwandten Arten wie *C. glabrata* und *C. albicans* mit der Extraktionsmethode unterschiedliche Dinge erreicht werden.

Eine Studie von 2008 zeigte Hinweise, dass das Typisieren von *C. albicans*-Stämmen durch MALDI-TOF MS möglich sei. In dem Experiment wurde nicht die Extraktionsmethode benutzt, sondern eine Probe *C. albicans* wurde zunächst in Methanol fixiert und dann auf ein MALDI-Target aufgetragen und mit Sinapinsäure als Matrix überdeckt. In der Studie wurden fünf Stämme von *C. albicans* betrachtet und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Stamm zusätzliche Biomarkerpeaks exprimiert, die die anderen Stämme nicht zeigten (Qian et al. 2008). Allerdings fand weder ein Datenbanksabgleich statt noch konnte gezeigt werden, dass die Methode reproduzierbar sei. Es liegt im Bereich des Möglichen, dass die Analyse des Stammes einfach besser war und somit mehr Proteine freigesetzt wurden. Ein größeres Studienkollektiv wäre wünschenswert gewesen. Interessanterweise lagen die unterschiedlichen Peaks in einem anderen Bereich als in der hier vorliegenden Studie, nämlich im Bereich von 11000 – 13000 m/z. Andererseits geben diese Experimente auch einen Hinweis darauf, dass unter einer unterschiedlichen Präparation verschiedene Ergebnisse und visuelle Unterschiede für *C. albicans* zu erzielen sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch Etablierung der neuen Acetonitril-Fastprep-Methode zum ersten Mal gelungen ist, für ein großes Kollektiv von *C.-albicans*-Stämmen visuelle Unterschiede zwischen den MALDI-Spektren zu erzielen und somit die Stämme unterhalb des Spezieslevel zu gruppieren. Es bestätigt sich damit, dass durch die mechanische Zerstörung der Zellhülle verbesserte Spektren produziert werden können.

4.4 Signifikante Korrelation des Peakmusters B mit 5FC-Resistenzgenotyp, keine Korrelation mit *MTL*-Locus oder MLST-Klade

Anhand der Ergebnisse konnten die 90 *C.-albicans*-Stämme in fünf Peakmuster eingeteilt werden, die allerdings nur in geringem Maße mit den MLST-Kladen übereinstimmten. Dennoch bleibt festzuhalten, dass man die Stämme gruppieren kann, eventuell in so genannte MALDI-Kladen. Im Gegensatz zur MLST ist diese Methode mit deutlich weniger Kosten und Ressourcen durchführbar. Bei der Bestimmung des *MTL*-Locus-Genotyps und des *FUR1*₃₀₁-Genotyps ließ sich zunächst feststellen, dass es keine Übereinstimmung zwischen dem *MTL*-Locus-Genotyp und den Peakgruppen gab. Dafür zeigte sich, dass alle Stämme mit dem *FUR1*₃₀₁-Resistenzgenotyp T/T in der MALDI-Analyse das Peakmuster B exprimierten. Mit einer Spezifität von 100 % bei einer Sensitivität von 68 % zeigte das alleinige Vorliegen des Peaks B den *FUR1*-Genotyp T/T an. Die Korrelation zwischen Peakmuster B und dem Vorliegen des Genotyps T/T war mit einem *p*-Wert von <0,001 signifikant. Dieses Peakmuster könnte also ein spezifischer Test sein für das Vorliegen der Mutationsvariante. Eventuell könnte dies eine Art Resistenzpeak sein

Die 5FC-Resistenz in *C. albicans* ist zu großen Teilen auf die Klade 1 begrenzt und ist auf einen Basenaustausch im *FUR1*-Gen zurückzuführen (Dodgson et al. 2004; Pujol et al. 2004). Die Resistenz hat demnach eine phylogenetische Komponente und könnte somit in der Darstellung des Proteoms durch ein MALDI-TOF-MS-Spektrum abgebildet werden.

Bei den einfacher aufgebauten Bakterien konnten bei einigen Arten schon Resistenzpeaks oder ein Cluster an Resistenzpeaks gezeigt werden. Die Gruppe um Lau untersuchte 2014,

ob man von einem MALDI-Spektrum auf eine Resistenz bei *Klebsiella pneumoniae* gegenüber Carbapenemen schließen kann. Es wurden insgesamt 38 Stämme analysiert, die bekannt bla_{KPC} -positiv oder bla_{KPC} -negativ waren. Durch das Übereinanderlegen von Spektren von bla_{KPC} -positiven und bla_{KPC} -negativen Stämmen fiel auf, dass es bei 11109 m/z einen Peak gab, der mit bla_{KPC} korrelierte. In allen 19 sequenzierten Stämmen mit Vorhandensein des bla_{KPC} -Gens war der Peak an dieser Stelle zu finden. Alle 19 sequenzierten Stämme ohne Vorliegen des bla_{KPC} -Gens zeigten an dieser Stelle keinen Peak. Die Ergebnisse stimmten mit den Genomsequenzierungen überein (Lau et al. 2014). Analog dazu konnte ein Peak bei 2415 m/z bei der Untersuchung von *Staphylococcus aureus* isoliert werden, der mit einer Resistenz gegen Methicillin einherging. Bei *Enterococcus faecium* gibt es Cluster von jeweils fünf Peaks anhand derer auf eine Resistenz gegenüber Vancomycin geschlossen werden kann (Griffin et al. 2012; Josten et al. 2014; Nakano et al. 2014).

Bei Hefeisolaten ist es bisher nicht gelungen, Spektren-Unterschiede zu produzieren oder mit der Extraktionsmethode einen oder mehrere Resistenzpeaks darzustellen.

Wie bereits in der Einleitung unter 1.4.3.6 beschrieben ist das Chromosom 5 oft von LOH betroffen. Die hier auf dem linken Arm liegenden Gene *ERG11* und *TAC1* stehen im Zusammenhang mit der Azolresistenz. Auch der sehr nah liegende *MTL*-Locus ist dementsprechend von LOH betroffen und ein Anhaltspunkt von Azolresistenz (Rustad et al. 2002).

Auf dem rechten Arm des Chromosom 5 liegt das *FUR1*-Gen, welches durch eine Punktmutation zur 5FC-Resistenz führen kann. Auch der rechte Arm des Chromosoms 5 kann von LOH betroffen sein, so dass ein eventuell vorhandenes mutiertes Allel verdoppelt wird und so zur 5FC-Resistenz führt. In einer Studie konnte auch ein Zusammenhang von 5FC-Resistenz mit dem Vorliegen eines homozygoten *MTL*-Locus hergestellt werden (Odds 2009).

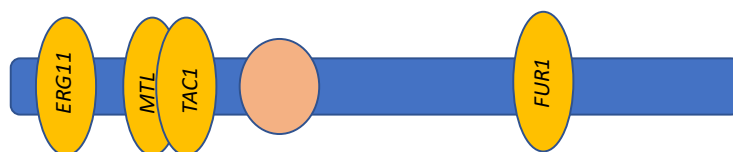


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Chromosom-5-Allels. Die Lagebeziehungen der Genloci *ERG11*, *MTL*, *TAC1* (alle auf dem linken Arm, oval) und *FUR1* (rechter Arm, oval) werden dargestellt. Kreis: Zentromer.

4.5 Limitationen und Ausblicke

Bei der vorliegenden Studie ist die Limitation der Stichprobenmenge und -verteilung zu nennen. So wurden insgesamt 90 unterschiedliche Stämme analysiert. Diese repräsentierten zwölf der 19 bisher beschriebenen Kladen. Darüber hinaus gehörten rund 50 % der analysierten Stämme zur Klade 1. Allerdings gehören circa 40 % aller *C.-albicans*-Stämme zu

Klade 1, somit entspricht die Verteilung nicht einer massiven Überrepräsentation. Außerdem ist die hier untersuchte Resistenz gegen 5FC, welche durch die Punktmutation im *FUR1*-Gen begründet ist, auf Klade 1 begrenzt.

In der Studie waren keine Stämme mit dem *FUR1*₃₀₁-Genotyp C/T präsent, dies ist durch einen LOH erklärbar. *FUR1* liegt auf dem Chromosom 5, bei dem LOH sehr häufig vorkommt.

Leider gelang es nicht zu eruieren, für welches Protein die unterschiedlichen Peaks stehen, beziehungsweise ob die Verlagerung des Peaks durch einen Aminosäureshift begründet ist. Emmele et al. haben Bakterien mit der MALDI untersucht und konnten bei Peakunterschieden im Spektrum durch eine eigens entwickelte Methode die Peakidentität einem Aminosäureshift zuordnen (Emele et al. 2019). Eventuell wäre es mittels dieser Methode möglich, die unterschiedlichen Peakidentitäten der Peaks A, B und C zu eruieren.

Um den Aminosäureshift zu entschlüsseln war eine einfache Suche im Proteom nicht ausreichend (Daten nicht gezeigt). Es wäre jedoch gegebenenfalls möglich durch eine Peptidsequenzierung zu neuen Erkenntnissen zu gelangen. Alternativ wäre ein bioinformatisches Verfahren auf dem Boden einer genomweiten Assoziationsstudie denkbar. Hierbei würde man beispielsweise für jedes Peakmuster einen repräsentierenden Stamm auswählen und dann das komplette Genom sequenzieren. Anschließend kann man in den genomischen Sequenzen nach SNP beziehungsweise Homozygotien suchen, insbesondere auf Chromosom 5 in der Nähe von *FUR1*.

Die PCR-Ergebnisse für den *MTL*-Locus sind mehrfach mit gleichem Ergebnis wiederholt worden. Jedoch erscheinen sie nicht plausibel, da zum einen die Anzahl der Homozygoten sehr hoch ist und zum anderen kein Stamm den *MTL*-Locus-Genotyp *MTL* α /*MTL* α trug. Beispielsweise zeigt eine Populationsstudie von Tavanti et al., dass nur bei rund 10 % der 415 untersuchten Stämme eine Homozygotie im *MTL*-Locus vorlag (Tavanti et al. 2005).

Um die Methode weiter zu evaluieren, wäre es demnach von Vorteil, die Versuche mit einem größeren Probenkollektiv durchzuführen, welches alle MLST-Kladen repräsentiert. Diese Stämme könnte man zuvor auch einer Resistenzprüfung mit allen gängigen Antimykotika unterziehen oder beispielsweise direkt auf Mutationen im *ERG11*-Gen untersuchen. Danach könnten eventuell auch Zusammenhänge mit anderen Resistenzen und den Peakmustern im MALDI-Spektrum hergestellt werden.

Zudem könnte bei einem oder mehreren Stämmen mit dem *FUR1*₃₀₁-Genotyp C/T die Spektren evaluiert werden.

Interessant ist darüber hinaus auch, ob diese Methode bei anderen *Candida*-Arten wie zum Beispiel dem eng verwandten *C. dubliensis* zu visuell sichtbaren Peakunterschieden im MALDI-Spektrum führt.

Zum ersten Mal ist es gelungen mittels MALDI-TOF MS für eine große Kohorte von *C. albicans*-Stämmen reproduzierbare, visuelle Peakunterschiede zu produzieren. Eventuell könnte man also hiermit Ausbrüche verfolgen und aufarbeiten. Zudem lässt sich noch sagen, dass die Methode im Vergleich zur Extraktionsmethode weniger zeitintensiv ist. Wäre es möglich, mittels dieser hier angewandten Methode zu typisieren, wäre es auch wesentlich schneller, günstiger und weniger personalintensiv als das Typisieren mittels MLST beziehungsweise MLP.

5 Zusammenfassung

C. albicans ist ein weit verbreiteter, fakultativ pathogener Keim. Der Großteil der *C.-albicans*-Infektionen ist lokal und oberflächlich begrenzt, im Falle eines immunkompromittierten Patienten kann es jedoch zu lebensgefährlichen, systemischen Infektionen kommen.

Durch den Einsatz von *multi locus sequence typing* ist es möglich, *C.-albicans*-Stämme weiter zu gruppieren. Bei dieser Methode werden mittels festgelegter Gensequenzen verschiedene Sequenztypen gebildet, anhand derer sich verschiedene Stämme nach Kladen aufteilen lassen. Insgesamt können 19 Kladen unterschieden werden.

Obwohl die Vermehrung von *C. albicans* zumeist klonal abläuft, gibt es eine Art von Fortpflanzung, welche aufgrund ihrer nicht vollständigen meiotischen Teilung auch Parasex genannt wird. Dem Mechanismus liegt eine Homozygotie im *MTL*-Locus zugrunde. Eine Homozygotie im *MTL*-Locus kann mit einer verringerten Suszeptibilität gegenüber Azolen einhergehen.

Zur Behandlung von invasiven Mykosen stehen unter anderem als Antimykotika Flucytosin und Azole zur Verfügung. Der Resistenzmechanismus gegen Flucytosin ist in einem Basenaustausch im *FUR1*-Gen begründet und ist auf die MLST-Klade 1 beschränkt. Bei den Azolen gibt es verschiedene Resistenzmechanismen, von denen einer auf dem gleichen Chromosomenarm wie das *FUR1*-Gen und der *MTL*-Locus lokalisiert ist.

MALDI-TOF MS ist eine schnelle und genaue Methode der Speziesbestimmung in der Mikrobiologie. Für *C. albicans* ist mittels einer Extraktionsmethode die Speziesbestimmung auf sehr hohem Level etabliert. Eine weitere Unterscheidung anhand der Spektren in Bezug auf Gruppierungen oder Resistenzstatus ist jedoch bisher nicht beschrieben.

Für die vorliegende Arbeit wurde zunächst der *MTL*-Locus-Genotyp durch PCR und Gelelektrophorese sowie der *FUR1*₃₀₁-Genotyp durch PCR und anschließende Sequenzierung erhoben. Im Anschluss wurde die Extraktionsmethode variiert, um zu untersuchen, ob sich die Massenspektren verändern beziehungsweise verbessern ließen. Als dies nicht gelang, wurde ein neues Protokoll etabliert, bei dem die Probe mittels mechanischer Kraft durch Vermischung mit Glasperlen bearbeitet wurde. Hierdurch gelang es zwischen den verschiedenen Stämmen Spektrenunterschiede sichtbar zu machen. Dies gelang bei weiterhin guter Speziesidentifikation. Insgesamt konnten drei Peaks dargestellt werden, deren Vorhandensein sich je nach Stamm unterschied. Anhand der Unterschiede konnten die Stämme in fünf Gruppen eingeteilt werden.

Zusätzlich zu dieser Möglichkeit, *C.-albicans*-Stämme anhand von charakteristischen Peaks im MALDI-Spektrum zu gruppieren, zeigte sich eine starke Korrelation eines Peaks mit dem Vorliegen der genetischen Resistenzvariante für Flucytosin. Eine Korrelation zu den MLST-Kladen oder dem *MTL*-Locus-Genotyp bestand nicht.

Mit dieser neuen Methode ist es zum ersten Mal gelungen, mit der MALDI-TOF MS *C. albicans* über das Spezieslevel hinaus einzuteilen. Zudem konnte das erste Mal ein Rückschluss von einem MALDI-Spektrum auf den Resistenzstatus eines Stammes gegenüber einem Antimykotikum gezogen werden.

6 Literaturverzeichnis

Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF (1996): Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 2835–2841

Amiri-Eliasi B, Fenselau C (2001): Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Anal Chem* 73, 5228–5231

Bader O (2013): MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* 13, 788–799

Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M (2011): Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 17, 1359–1365

Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T (2008): Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74, 5402–5407

Barchiesi F, Arzeni D, Caselli F, Scalise G (2000): Primary resistance to flucytosine among clinical isolates of *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother* 45, 408–409

Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, Parra A, Treccarichi EM, Sanguinetti M, Posteraro B, et al. (2013): Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol* 51, 4167–4172

Bennett RJ, Johnson AD (2003): Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J* 22, 2505–2515

Berman J, Hadany L (2012): Does stress induce (para)sex? Implications for *Candida albicans* evolution. *Trends Genet* 28, 197–203

Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, et al. (2001): Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis* 33, 177–186

Bouchonville K, Forche A, Tang KES, Selmecki A, Berman J (2009): Aneuploid Chromosomes Are Highly Unstable during DNA Transformation of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 8, 1554–1566

Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C (2002): Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 40, 1290–1297

Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, Gow N a. R, Magnier A, Davidson AD, Maiden MCJ, D'Enfert C, Odds FC (2003): Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 41, 5265–5266

Burckhardt I, Zimmermann S (2011): Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 49, 3321–3324

Candida albicans MLST Home Page. <https://pubmlst.org/calbicans/>; abgerufen am 25.03.2020

Cassagne C, Cella AL, Suchon P, Normand AC, Ranque S, Piarroux R (2013): Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med Mycol* 51, 371–377

Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, Chen S, Kaur H, Capoor M, Chhina D, Rao R, Eshwara VK, Xess I, et al. (2015): Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med* 41, 285–295

Chibana H, Beckerman JL, Magee PT (2000): Fine-Resolution Physical Mapping of Genomic Diversity in *Candida albicans*. *Genome Res* 10, 1865–1877

Chowdhary A, Lee-Yang W, Lasker BA, Brandt ME, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA (2006): Comparison of multilocus sequence typing and Ca3 fingerprinting for molecular subtyping epidemiologically-related clinical isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol* 44, 405–417

Christner M, Trusch M, Rohde H, Kwiatkowski M, Schlüter H, Wolters M, Aepfelbacher M, Hentschke M (2014): Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 9, e101924

Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, Nouér SA, Nucci M (2014): Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Med* 40, 1489–1498

Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al. (2012): ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 18 Suppl 7, 19–37

Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A, Berman J, Bille J, Sanglard D (2006): A mutation in *Tac1p*, a transcription factor regulating CDR1 and

CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* 172, 2139–2156

Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, Berman J, Sanglard D (2007): Genotypic Evolution of Azole Resistance Mechanisms in Sequential *Candida albicans* Isolates. *Eukaryot Cell* 6, 1889–1904

Daniels KJ, Srikantha T, Lockhart SR, Pujol C, Soll DR (2006): Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *EMBO J* 25, 2240–2252

De Carolis E, Vella A, Florio AR, Posteraro P, Perlin DS, Sanguinetti M, Posteraro B (2012): Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 50, 2479–2483

Demirev PA, Hagan NS, Antoine MD, Lin JS, Feldman AB (2013): Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 24, 1194–1201

Dhieb C, Normand AC, L'Ollivier C, Gautier M, Vranckx K, El Euch D, Chaker E, Hendrickx M, Dalle F, Sadfi N, et al. (2015a): Comparison of MALDI-TOF mass spectra with microsatellite length polymorphisms in *Candida albicans*. *J Mass Spectrom* 50, 371–377

Dhieb C, Normand AC, Al-Yasiri M, Chaker E, El Euch D, Vranckx K, Hendrickx M, Sadfi N, Piarroux R, Ranque S (2015b): MALDI-TOF typing highlights geographical and fluconazole resistance clusters in *Candida glabrata*. *Med Mycol* 53, 462–469

Dodgson AR, Dodgson KJ, Pujol C, Pfaller MA, Soll DR (2004): Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2223–2227

Dunkel N, Liu TT, Barker KS, Homayouni R, Morschhäuser J, Rogers PD (2008a): A gain-of-function mutation in the transcription factor *Upc2p* causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell* 7, 1180–1190

Dunkel N, Blass J, Rogers PD, Morschhäuser J (2008b): Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol* 69, 827–840

El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M (2011): Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One* 6, e24720

Eliakim-Raz N, Babaoff R, Yahav D, Yanai S, Shaked H, Bishara J (2016):

Epidemiology, microbiology, clinical characteristics, and outcomes of candidemia in internal medicine wards—a retrospective study. *Int J Infect Dis* 52, 49–54

Emele MF, Možina SS, Lugert R, Bohne W, Masanta WO, Riedel T, Groß U, Bader O, Zautner AE (2019): Proteotyping as alternate typing method to differentiate *Campylobacter coli* clades. *Sci Rep* 9, 4244

Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL (2010): Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48, 2110–2115

Forche A, Alby K, Schaefer D, Johnson AD, Berman J, Bennett RJ (2008): The Parasexual Cycle in *Candida albicans* Provides an Alternative Pathway to Meiosis for the Formation of Recombinant Strains. *PLoS Biol* 6, e110

Forche A, Magee PT, Selmecki A, Berman J, May G (2009): Evolution in *Candida albicans* Populations During a Single Passage Through a Mouse Host. *Genetics* 182, 799–811

Forche A, Abbey D, Pisithkul T, Weinzierl MA, Ringstrom T, Bruck D, Petersen K, Berman J (2011): Stress alters rates and types of loss of heterozygosity in *Candida albicans*. *mBio* 2, e00129-11

Fujinami Y, Kikkawa HS, Kurosaki Y, Sakurada K, Yoshino M, Yasuda J (2011): Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res* 166, 77–86

Garcia-Hermoso D, Cabaret O, Lecellier G, Desnos-Ollivier M, Hoinard D, Raoux D, Costa J-M, Dromer F, Bretagne S (2007): Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-Based typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 45, 3958–3963

Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, Bearden DT (2006): Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis* 43, 25–31

Garnacho-Montero J, Díaz-Martín A, García-Cabrera E, Ruiz Pérez de Pipaón M, Hernández-Caballero C, Aznar-Martín J, Cisneros JM, Ortiz-Leyba C (2010): Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 3149–3154

Georgopapadakou NH, Walsh TJ (1996): Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 279–291

Goyer M, Lucchi G, Ducoroy P, Vagner O, Bonnin A, Dalle F (2012): Optimization of the preanalytical steps of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

spectrometry identification provides a flexible and efficient tool for identification of clinical yeast isolates in medical laboratories. *J Clin Microbiol* 50, 3066–3068

Gräser Y, Volovsek M, Arrington J, Schönian G, Presber W, Mitchell TG, Vilgalys R (1996): Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12473–12477

Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, Hamilton B, Venter D (2012): Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol* 50, 2918–2931

Haigh JD, Green IM, Ball D, Eydmann M, Millar M, Wilks M (2013): Rapid identification of bacteria from bioMérieux BacT/ALERT blood culture bottles by MALDI-TOF MS. *Br J Biomed Sci* 70, 149–155

Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, Kashon ML, Slaven JE, Janotka E, Blachere FM, Schmechel D, Beezhold DH (2008a): Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Anal Biochem* 380, 276–281

Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, Kashon ML, Slaven JE, Janotka E, Blachere FM, Schmechel D, Beezhold DH (2008b): Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22, 2555–2560

Hickman MA, Zeng G, Forche A, Hiraikawa MP, Abbey D, Harrison BD, Wang YM, Su C, Bennett RJ, Wang Y, Berman J (2013): The „obligate diploid“ *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature* 494, 55–59

Holley A, Dulhunty J, Blot S, Lipman J, Lobo S, Dancer C, Rello J, Dimopoulos G (2009): Temporal trends, risk factors and outcomes in albicans and non-albicans candidaemia: an international epidemiological study in four multidisciplinary intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 33, 554.e1–7

Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM (2014): MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Lett Appl Microbiol* 58, 325–329

Huang G, Wang H, Chou S, Nie X, Chen J, Liu H (2006): Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12813–12818

Hull CM, Johnson AD (1999): Identification of a mating type-like locus in the asexual

pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285, 1271–1275

Hull CM, Raisner RM, Johnson AD (2000): Evidence for mating of the „asexual“ yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289, 307–310

Johansson A, Nagy E, Sóki J, ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections) (2014): Detection of carbapenemase activities of *Bacteroides fragilis* strains with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe* 26, 49–52

Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, et al. (2004): The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7329–7334

Jordà-Marcos R, Alvarez-Lerma F, Jurado M, Palomar M, Nolla-Salas J, León MA, León C, EPCAN Study Group (2007): Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses* 50, 302–310

Josten M, Dischinger J, Szekat C, Reif M, Al-Sabti N, Sahl H-G, Parcina M, Bekeredjian-Ding I, Bierbaum G (2014): Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol* 304, 1018–1023

Kam AP, Xu J (2002): Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43, 19–28

Kanafani ZA, Perfect JR (2008): Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 46, 120–128

Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Einsele H (1997): Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett* 400, 80–82

Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL, Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators (2011): *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med* 39, 665–670

Klingspor L, Tortorano AM, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, Velegriaki A, Kibbler C, Meis JF, Sabino R, et al. (2015): Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin Microbiol Infect* 21, 87.e1-87.e10

Kneale M, Bartholomew JS, Davies E, Denning DW (2016): Global access to antifungal therapy and its variable cost. *J Antimicrob Chemother* 71, 3599–3606

- Köhling HL, Bittner A, Müller KD, Buer J, Becker M, Rübber H, Rettenmeier AW, Mosel F (2012): Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol* 61, 339–344
- Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann O, Weig M, Bader O, Groß U (2012): Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One* 7, e40004
- Kullberg BJ, Arendrup MC (2015): Invasive Candidiasis. *N Engl J Med* 373, 1445–1456
- Kumamoto CA (2011): Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr Opin Microbiol* 14, 386–391
- La Scola B, Raoult D (2009): Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 4, e8041
- Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K (2014): Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol* 52, 4155–4162
- Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM (2013): Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 51, 828–834
- Lau AF, Wang H, Weingarten RA, Drake SK, Suffredini AF, Garfield MK, Chen Y, Gucek M, Youn JH, Stock F, et al. (2014): A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 52, 2804–2812
- Leroy O, Bailly S, Gangneux JP, Mira JP, Devos P, Dupont H, Montravers P, Perrigault PF, Constantin JM, Guillemot D, et al. (2016): Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study. *Ann Intensive Care* 6, 2
- Lockhart SR, Pujol C, Daniels KJ, Miller MG, Johnson AD, Pfaller MA, Soll DR (2002): In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* 162, 737–745
- Lockhart SR, Daniels KJ, Zhao R, Wessels D, Soll DR (2003): Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2, 49–61
- Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F, French Mycosis Study Group (2011): Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 532–538

- Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F, French Mycosis Study Group (2014): Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med* 40, 1303–1312
- Magee BB, Magee PT (2000): Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science* 289, 310–313
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, et al. (1998): Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3140–3145
- Månsson V, Resman F, Kostrzewa M, Nilson B, Riesbeck K (2015): Identification of *Haemophilus influenzae* Type b Isolates by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 53, 2215–2224
- Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, Fekkar A, Brossas JY, Brun S, Snounou G, Hennequin C, Sanglard D, et al. (2009): MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* 9, 4627–4631
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horr  R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl H-G (2009): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47, 2912–2917
- M an M, Marchetti O, Calandra T (2008): Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care* 12, 204
- Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, De Carolis E, Vella A, Cacioni M, Buzi S, Nardelli E, Bistoni F, et al. (2013): Typing of Nosocomial Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 51, 603–606
- Meyer E, Geffers C, Gastmeier P, Schwab F (2013): No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. *Euro Surveill* 18, 20505
- Moran G, Stokes C, Thewes S, Hube B, Coleman DC, Sullivan D (2004): Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology (Reading)* 150, 3363–3382
- Morschhäuser J (2016): The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol* 54, 192–201

- Nakano S, Matsumura Y, Kato K, Yunoki T, Hotta G, Noguchi T, Yamamoto M, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S (2014): Differentiation of vanA-positive *Enterococcus faecium* from vanA-negative *E. faecium* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Int J Antimicrob Agents* 44, 256–259
- Nobile CJ, Johnson AD (2015): *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol* 69, 71–92
- Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN (2017): *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol* 15, 96–108
- Normand AC, Gabriel F, Riat A, Cassagne C, Bourgeois N, Huguenin A, Chauvin P, De Geyter D, Bexkens M, Rubio E, et al. (2020): Optimization of MALDI-ToF mass spectrometry for yeast identification: a multicenter study. *Med Mycol* 58, 639–649
- Odds FC: *Candida and candidosis: a review and bibliography*. 2nd edition. Bailliere Tindall, London 1988
- Odds FC (2009): In *Candida albicans*, resistance to flucytosine and terbinafine is linked to MAT locus homozygosity and multilocus sequence typing clade 1. *FEMS Yeast Res* 9, 1091–1101
- Odds FC, Jacobsen MD (2008): Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. *Eukaryot Cell* 7, 1075–1084
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, et al. (2016): Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 62, e1-50
- Pfaller MA (2012): Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 125, S3-13
- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Huynh H, Hollis RJ, Diekema DJ (2002): In Vitro Activities of 5-Fluorocytosine against 8,803 Clinical Isolates of *Candida* spp.: Global Assessment of Primary Resistance Using National Committee for Clinical Laboratory Standards Susceptibility Testing Methods. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3518–3521
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA, Global Antifungal Surveillance Group (2010a): Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 48, 1366–1377
- Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN (2010b): Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program

(2008–2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 68, 278–283

Polak A, Scholer HJ (1975): Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy* 21, 113–130

Polak A, Wain WH (1977): The influence of 5-fluorocytosine on nucleic acid synthesis in *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*. *Chemotherapy* 23, 243–259

Pujol C, Reynes J, Renaud F, Raymond M, Tibayrenc M, Ayala FJ, Janbon F, Mallié M, Bastide JM (1993): The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9456–9459

Pujol C, Pfaller MA, Soll DR (2004): Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 262–266

Pulcrano G, Roscetto E, Iula VD, Panellis D, Rossano F, Catania MR (2012): MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 2919–2928

Qian J, Cutler JE, Cole RB, Cai Y (2008): MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Anal Bioanal Chem* 392, 439–449

Quiles-Melero I, García-Rodríguez J, Gómez-López A, Mingorance J (2012): Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 67–71

Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, Wenzel RP (1990): Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J Clin Microbiol* 28, 2733–2738

Robles JC, Koreen L, Park S, Perlin DS (2004): Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 42, 2480–2488

Rustad TR, Stevens DA, Pfaller MA, White TC (2002): Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. *Microbiology (Reading)* 148, 1061–1072

Sampaio P, Gusmão L, Correia A, Alves C, Rodrigues AG, Pina-Vaz C, Amorim A, Pais C (2005): New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. *J Clin Microbiol* 43, 3869–3876

- Sanglard D, Odds FC (2002): Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2, 73–85
- Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J (1997): Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology (Reading)* 143 (Pt 2), 405–416
- Sasse C, Dunkel N, Schäfer T, Schneider S, Dierolf F, Ohlsen K, Morschhäuser J (2012): The stepwise acquisition of fluconazole resistance mutations causes a gradual loss of fitness in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 86, 539–556
- Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, Watanabe M, Satoh M, Matsutani T, Kobayashi M, et al. (2014): Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin Chim Acta* 435, 59–61
- Selmecki A, Forche A, Berman J (2006): Aneuploidy and Isochromosome Formation in Drug-Resistant *Candida albicans*. *Science* 313, 367–370
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009): Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49, 543–551
- Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D (2010): MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 5, 1733–1754
- Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM (1999): Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 12, 40–79
- Slavin MA, Sorrell TC, Marriott D, Thursky KA, Nguyen Q, Ellis DH, Morrissey CO, Chen SCA, Australian Candidemia Study, Australasian Society for Infectious Diseases (2010): *Candidaemia* in adult cancer patients: risks for fluconazole-resistant isolates and death. *J Antimicrob Chemother* 65, 1042–1051
- Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR (1987): „White-opaque transition“: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 169, 189–197
- Sobel JD (1997): Vaginitis. *N Engl J Med* 337, 1896–1903
- Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D’Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, Tumbarello M, Canu G, Treccarichi EM, Parisi G, et al. (2012): Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 50, 176–179

- Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M (2012): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 50, 927–937
- Srikantha T, Borneman AR, Daniels KJ, Pujol C, Wu W, Seringhaus MR, Gerstein M, Yi S, Snyder M, Soll DR (2006): TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 5, 1674–1687
- Stevenson LG, Drake SK, Murray PR (2010): Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48, 444–447
- Stiller RL, Bennett JE, Scholer HJ, Wall M, Polak A, Stevens DA (1983): Correlation of in vitro susceptibility test results with in vivo response: flucytosine therapy in a systemic candidiasis model. *J Infect Dis* 147, 1070–1077
- Sudbery P, Gow N, Berman J (2004): The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12, 317–324
- Tavanti A, Gow NAR, Senesi S, Maiden MCJ, Odds FC (2003): Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 41, 3765–3776
- Tavanti A, Davidson AD, Fordyce MJ, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC (2005): Population Structure and Properties of *Candida albicans*, as Determined by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 43, 5601–5613
- Thompson GR, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, Redding SW, Patterson TF (2010): Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 109, 488–495
- van het Hoog M, Rast TJ, Martchenko M, Grindle S, Dignard D, Hogues H, Cuomo C, Berriman M, Scherer S, Magee B, et al. (2007): Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol* 8, R52
- van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010): High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 48, 900–907
- Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, Posteraro P, Perlin DS, Kostrzewa M, Posteraro B, Sanguinetti M (2013): Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol* 51, 2964–2969
- Waldorf AR, Polak A (1983): Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 23, 79–85

- Wang L, Lu X, Wu W, Sui W, Zhang G (2014): Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in the screening of vanA-positive *Enterococcus faecium*. *Eur J Mass Spectrom Chichester* 20, 461–465
- Whelan WL, Kerridge D (1984): Decreased activity of UMP pyrophosphorylase associated with resistance to 5-fluorocytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 26, 570–574
- Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M (2011): MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol* 301, 64–68
- Wu W, Pujol C, Lockhart SR, Soll DR (2005): Chromosome Loss Followed by Duplication Is the Major Mechanism of Spontaneous Mating-Type Locus Homozygosity in *Candida albicans*. *Genetics* 169, 1311–1327
- Wu W, Lockhart SR, Pujol C, Srikantha T, Soll DR (2007): Heterozygosity of genes on the sex chromosome regulates *Candida albicans* virulence. *Mol Microbiol* 64, 1587–1604
- Yaman G, Akyar I, Can S (2012): Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73, 65–67
- Yang SP, Chen YY, Hsu HS, Wang FD, Chen L, Fung CP (2013): A risk factor analysis of healthcare-associated fungal infections in an intensive care unit: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis* 13, 10
- Zautner AE, Masanta WO, Weig M, Groß U, Bader O (2015): Mass Spectrometry-based PhyloProteomics (MSPP): A novel microbial typing Method. *Sci Rep* 5, 13431
- Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, Sedaghat F, Vosoghi M (2011): Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol* 49, 208–211
- Zordan RE, Galgoczy DJ, Johnson AD (2006): Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12807–12812

Danksagung

Ich danke Prof. Uwe Groß für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, in diesem spannenden Fachbereich zu promovieren.

Ein großer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Oliver Bader für die großartige Unterstützung und fachliche Zusammenarbeit in dieser Zeit. Die Diskussionsrunden in deinem Büro mit dem guten Instantkaffee ohne Milch und deine ständige Bereitschaft noch schnell etwas durchzudiskutieren. Deine Begabung, mir die Begeisterung für die Mykologie zu vermitteln haben mir immer Mut gegeben, diesen Marathon zu beenden.

Ein großer Dank geht an Agnieszka Goretzki, die mich mit unfassbar viel Geduld im Labor unterstützt hat und die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, genauso wie Iris Eben. Vielen Dank auch an Emilia Gomez, die einen auch noch am Sonntagabend aus einer verzweifelten Lage rettete, wenn die MALDI gestreikt hat.

Ein großer Dank geht an das gesamte Team der Mikrobiologie Pia, Matthias, Marut, Ichsan, Sarah, Michael Weig, Martin Kuhns und Andreas Zautner und das gesamte Diagnostik-Team, die mich allesamt sehr freundlich aufgenommen und jederzeit fachlich unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter der statistischen Kurzberatung der UMG für die gute Beratung.

Und euch, lieben *Candida*-Stämmen aus der EUCAST-Sammlung, für euer zuverlässiges Wachstum und die interessanten Erkenntnisse, die ihr mir offenbart habt.