



HEINRICH HEINE  
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

---

**Identifizierung und Epidemiologie von Pilzerregern bei  
immunsupprimierten Patienten mittels moderner  
molekularbiologischer Methoden**

---

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Sebastian Rahn**

aus Detmold

Düsseldorf, Mai 2018

aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Erstgutachter:** Herr Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

**Zweitgutachter:** Herr Prof. Dr. rer. nat. Rainer Kalscheuer

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2018



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>iv</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>v</b>
<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>vii</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Humanpathogene Pilze und ihre Krankheitsbilder .....	2
1.1.1	Oberflächliche Pilzinfektionen bei immunkompetenten Menschen.....	2
1.1.2	Invasive Pilzinfektionen und betroffene Patientengruppen .....	2
1.1.3	Klinische Epidemiologie und Manifestation von invasiven Pilzinfektionen .....	4
1.2	Diagnostik von Pilzinfektionen .....	7
1.2.1	Klassische Diagnostik-Verfahren.....	7
1.2.2	Molekularbiologische Diagnostik von Pilzen.....	9
1.3	Zielsetzung der Dissertation .....	11
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
2.1	Materialien .....	12
2.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	12
2.1.2	Chemikalien, Enzyme und Antibiotika .....	13
2.1.3	Geräteverzeichnis.....	14
2.1.4	Kits.....	15
2.1.5	Pufferlösungen .....	15
2.1.6	Kulturmedien.....	16
2.1.7	Organismen .....	18
2.1.7.1	Verwendete Pilzstämmen.....	18
2.1.7.2	Bakterienstämmen .....	20
2.1.7.3	Plasmidvektor .....	20

2.1.7.4	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte gentechnisch veränderte Organismen ....	20
2.1.8	Klinisches Probenmaterial und Ethikvotum .....	21
2.1.9	Verwendete Oligonukleotide.....	22
2.2	Mikrobiologische Methoden .....	24
2.2.1	Anzucht und Kultivierung von Pilzen .....	24
2.2.1.1	Kultivierung auf Agarplatten für eine unmittelbare Verwendung .....	24
2.2.1.2	Kultivierung in Flüssigkultur zur langfristigen Aufbewahrung von Pilzen .....	25
2.2.1.3	Ernte von Pilzen .....	25
2.2.2	Mikroskopische Auszählung von Pilz-Konidien .....	26
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	28
2.3.1	Isolierung von genomischer DNA.....	28
2.3.1.1	Mechanische Lyse von Pilzzellen .....	29
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	29
2.3.2.1	Konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese .....	30
2.3.2.2	Realtime-PCR mit DNA-Farbstoffen, Schmelzkurvenanalyse und TaqMan-Sonden .....	31
2.3.3	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten.....	34
2.3.3.1	Direkte Aufreinigung von Amplifikaten aus PCR-Reaktionen.....	34
2.3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
2.3.4	Sequenzierung.....	35
2.3.5	Klonierung von PCR-Amplifikations-Kontrollen .....	35
2.3.5.1	Ligation von PCR-Produkten in pGemT .....	35
2.3.5.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien .....	36
2.3.5.3	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	36
2.3.5.4	Herstellung von Bakterien-Glycerinstocks .....	36
2.4	Computerbasierte Methoden.....	37
2.4.1	Erfassung der Sequenzdaten .....	37
2.4.2	Homologievergleiche mittels BLAST-Analyse.....	38
2.4.3	Das Geneious-Softwarepaket .....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
3.1	Die ribosomale DNA als geeignete Zielregion der fuPCR .....	40
3.2	Sammlung von rDNA-Sequenzen zum Design von fuPCR-Primern .....	45

3.3	Strukturierung der fuPCR .....	49
3.4	Entwicklung der zweig- und familienspezifischen fuPCR-Primer .....	53
3.4.1	Auswertung der fuPCR-Schmelzkurvenanalysen .....	57
3.4.2	Anpassung der Primerlänge.....	58
3.4.3	Bestimmung der charakteristischen DNA-Schmelzpunkte der fuPCR-Produkte von 32 Pilzspezies.....	60
3.4.4	Optimierung der PCR-Bedingungen und Minimierung von Primerdimeren .....	61
3.4.5	Austestung der Sensitivitätsgrenzen .....	64
3.4.6	Speziesspezifische Sonden für <i>Aspergillus</i> und <i>Candida</i> .....	65
3.4.7	Übersicht über die „First Line“-fuPCR-Primer und „Second Line“-TaqMan-Sonden .....	69
3.5	Design universeller Pan-Fungal-Primer.....	71
3.6	Untersuchung von klinischen Materialien hämatologischer Patienten und Kontrollen ..	76
3.6.1	Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs.....	76
3.6.2	Detektion von pathogenen Pilzen in klinischen Proben.....	78
3.6.3	Korrelation der PCR-Ergebnisse mit klinischen Untersuchungsdaten.....	82
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>85</b>
4.1	Vorteile der neu entwickelten fuPCR gegenüber publizierten PCR-Methoden .....	86
4.2	Test der fuPCR mit klinischen Proben hämatologischer Patienten .....	88
4.3	Die Ergebnisse der fuPCR im klinischen Kontext .....	95
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>115</b>
8.1	rDNA-Sequenzen zum Design von fuPCR-Primern.....	115
8.2	ITS1-ITS2-Sequenzen zur Erstellung des phylogenetischen Baums .....	124
8.3	Publikationen .....	125
8.4	Danksagung .....	127
8.5	Selbstständigkeitserklärung.....	128

# I. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Kultivierung von Pilzen auf Agarplatten.....	24
<b>Abbildung 2:</b> Mikroskopische Auszählung von Pilz-Konidien.....	27
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Übersicht des ribosomalen RNA-Genclusters bei Eukaryonten .....	41
<b>Abbildung 4:</b> Multiple Sequenzalignments von sieben <i>Candida</i> - und neun <i>Trichosporon</i> -Spezies. ....	43
<b>Abbildung 5:</b> Phylogenetischer Baum von 71 Pilzspezies der fuPCR.....	50
<b>Abbildung 6:</b> Flussdiagramm des Entwicklungsprozesses der zweig- und familienspezifischen Primer der fuPCR.....	53
<b>Abbildung 7:</b> Multiples Alignment der 5.8S-ITS2-Region von 19 Pilzspezies.....	55
<b>Abbildung 8:</b> Schmelzkurvenanalyse mit PCR-Amplifikaten von <i>C. Krusei</i> -DNA mit den Primern CanF und ITS4.2. ....	57
<b>Abbildung 9:</b> Schmelzkurvenanalyse der Gradienten-PCR zur Anpassung der Primer-Länge für die Amplifikation von <i>Absidia glauca</i> -DNA. ....	58
<b>Abbildung 10:</b> Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse seriell verdünnter <i>Aspergillus flavus</i> -DNA (Reaktion A).....	62
<b>Abbildung 11:</b> Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse seriell verdünnter Pilz-DNA .....	63
<b>Abbildung 12:</b> Austestung vier verschiedener Mastermixe für den Einsatz mit TaqMan-Sonden. ....	67
<b>Abbildung 13:</b> x-fache Verbesserung der Amplifikation von <i>Candida</i> spp. bei Verwendung verschiedener TaqMan-Mixe im Vergleich zum Eurogentec Mastermix .....	68
<b>Abbildung 14:</b> Schematische Darstellung der Bindungsstellen der gruppen- und familienspezifischen Primer, Sonden und des konservierten ITS4.2- Reversprimers innerhalb des ribosomalen Genclusters .....	70
<b>Abbildung 15:</b> Schematische Übersicht der Pan-Fungal-Primerbindestellen innerhalb des ribosomalen Genclusters.....	72
<b>Abbildung 16:</b> 2 <sup>(-ΔCT)</sup> -Vergleich der Pan-Primerkombinationen.....	73
<b>Abbildung 17:</b> Binderegion des degenerierten Primers PanF5 .....	74
<b>Abbildung 18:</b> Durch fuPCR-Assay und Kultivierung detektierter prozentualer Anteil an Pilzen in Rachenabstrichen, EDTA-Blut und Blutseren von immunsupprimierten Patienten (IC) und gesunden Probanden (HI) .....	79
<b>Abbildung 19:</b> Nachgewiesene Pilze durch fuPCR und Kultivierung in 56 Rachenabstrichen von immunsupprimierten Patienten .....	81

## II. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Risikofaktoren für invasive Pilzinfektionen.....	3
<b>Tabelle 2:</b> Auflistung aller genutzten Verbrauchsmaterialien .....	12
<b>Tabelle 3:</b> Auflistung der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Antibiotika.....	13
<b>Tabelle 4:</b> Auflistung aller verwendeten Geräte und Apparaturen .....	14
<b>Tabelle 5:</b> Auflistung aller verwendeten Kits.....	15
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Lösungen und Puffer .....	15
<b>Tabelle 7:</b> Auflistung der verwendeten klinischen Isolate und Referenzstämme .....	19
<b>Tabelle 8:</b> Auflistung der hergestellten gentechnisch veränderten Organismen .....	21
<b>Tabelle 9:</b> Liste der verwendeten Oligonukleotide .....	22
<b>Tabelle 10:</b> Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für eine konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese .....	30
<b>Tabelle 11:</b> Auflistung des PCR-Laufprotokolls für eine konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese .....	30
<b>Tabelle 12:</b> Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für eine Realtime-PCR mit DNA- Farbstoffen und Schmelzkurvenanalyse .....	31
<b>Tabelle 13:</b> Auflistung des PCR-Laufprotokolls für eine Realtime-PCR mit SYBR Green DNA- Farbstoff und Schmelzkurvenanalyse .....	32
<b>Tabelle 14:</b> Zusammensetzung des PCR-Ansatzes mit TaqMan-Sonden .....	33
<b>Tabelle 15:</b> Primer- und Sonden-Kombinationen der TaqMan-Mixe sowie angeregte Farbkanäle .....	33
<b>Tabelle 16:</b> Auflistung des PCR-Laufprotokolls mit TaqMan-Sonden .....	34
<b>Tabelle 17:</b> Anzahl der ITS1-5.8S-ITS2-Sequenzen für die verschiedenen Pilzspezies .....	48
<b>Tabelle 18:</b> Aufbau des fuPCR-Assays und Auflistung der nachzuweisenden Pilzgenera in den einzelnen Reaktionen .....	51
<b>Tabelle 19:</b> Temperaturgradienten zur Anpassung der Primerlänge .....	59
<b>Tabelle 20:</b> Charakteristische Schmelzpunkte von Pilz-DNA in den PCR-Reaktionen A - G .....	60
<b>Tabelle 21:</b> Detektionslimit der sieben familienspezifischen PCRs .....	64
<b>Tabelle 22:</b> Zusammenfassung der Testkriterien für die familienspezifischen Forwardprimer und speziesspezifischen Sonden.....	66
<b>Tabelle 23:</b> CT-Werte für den Vergleich der TaqMan-Mastermixe .....	68
<b>Tabelle 24:</b> Klinische Charakteristiken der Patienten- und Kontrollgruppe im Zuge der Probenentnahme .....	77
<b>Tabelle 25:</b> Ergebnisse der fuPCR und Standardkultivierung .....	80



<b>Tabelle 26:</b> Zeitliche Korrelation von PCR-positiv getesteten klinischen Proben mit Pneumonie-positiv beurteilten HR-CT-Thorax-Aufnahmen von Patienten .....	83
<b>Tabelle 27:</b> ACC-Nummern der verwendeten Sequenzdaten. ....	115

### III. Abkürzungsverzeichnis

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>ad.</b>	auffüllen auf
<b>BDG</b>	(1→3)-β-D-Glucan
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>CF</b>	Komplementfixierung (complement fixation)
<b>CT</b>	Schwellenwert-Zyklus (Threshold Cycle)
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes oder Milli-Q (Millipore)-Wasser
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
<b>dNTP</b>	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EIA</b>	Enzym-Immunoassay
<b>et al.</b>	et alii; und andere
<b>g</b>	Beschleunigung (m/s <sup>2</sup> )
<b>GM</b>	Galactomannan
<b>h</b>	Stunden
<b>HRCT</b>	hochauflösende Computertomographie
<b>HSCT</b>	hämatopoetische Stammzelltransplantation
<b>ID</b>	Immunodiffusion
<b>IGS</b>	intergenic spacer
<b>ITS</b>	internal transcribed spacer
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>l</b>	Liter
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimol
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>n</b>	Anzahl
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nM</b>	Nanomol
<b>nm</b>	Nanometer
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung

<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>pg</b>	Pikogram
<b>pH</b>	Negativer dekadischer Logarithmus der $H_3O^+$ -Ionenkonzentration
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Realtime-PCR
<b>rDNA</b>	ribosomale DNA
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rRNA</b>	ribosomale RNA
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
<b>U</b>	Unit
<b>UpM.</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter

# 1 EINLEITUNG

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte ist die Inzidenz von Pilzinfektionen bei schwerkranken Patienten dramatisch gestiegen. Aufgrund ihres oft lebensbedrohlichen Verlaufes haben diese Infektionen daher an großer Bedeutung für die Medizin gewonnen [1]. Fortschritte in den Bereichen der Transplantationsmedizin und Krebsbehandlung führten zu einem signifikanten Anstieg an Patienten in einem immungeschwächten Zustand, denen ein längeres Überleben durch ihre Behandlung ermöglicht wird [2, 3]. Als Folgeerscheinung sind diese Patienten jedoch verstärkt durch Pilzinfektionen gefährdet.

Pilze sind eukaryotische Lebewesen, die in unserer Umwelt natürlicherweise vorkommen und global verbreitet sind. Pilzinfektionen, auch Mykosen genannt, gehören zu den am meisten verbreiteten Infektionskrankheiten und nahezu jeder Mensch ist im Verlauf seines Lebens mindestens einmal von solch einer Infektion betroffen. Infektionen durch Pilze verursachen bei gesunden Menschen meistens oberflächliche und unangenehme, jedoch keine lebensbedrohlichen Erkrankungen. Menschen mit einem geschwächten Immunsystem können jedoch von außerordentlich gefährlichen, invasiven Pilzinfektionen betroffen werden. Bedingt durch die verlängerten Phasen der Neutropenie zählen daher Patienten mit hämatologischen Erkrankungen oder allogenen Stammzelltransplantationen und Patienten, die eine intensive immunsuppressive Therapie erhalten, zu den bedeutendsten Risikogruppen für eine Pilzinfektion [4, 5]. In Abhängigkeit des infizierten Organsystems und der Pilzart nehmen invasive Pilzinfektionen oft einen letalen Verlauf [6]. Selbst bei einem vorteilhaften Behandlungsverlauf verursachen diese Infektionen erhebliche Nebenwirkungen. Im Fall einer Pilzinfektion sind die involvierten Fachbereiche zudem gezwungen, eine zusätzliche stationäre antimykotische Therapie durchzuführen [7-9]. Ein Nebeneffekt dieser antimykotischen Behandlung stellt eine reduzierte Therapieintensität der primären Grunderkrankung dar, da die onkologische Therapie aufgrund von Pilzinfektionen verzögert wird und sich an die Infektionsbehandlung anpassen muss, was letztlich die Gefahr eines Rezidivs der onkologischen Grunderkrankung erhöht. All diese Gefahren und negativen Konsequenzen einer Pilzinfektion führen zu der dringenden Notwendigkeit, die Erreger schnell zu identifizieren, um sie anschließend effektiv therapieren zu können. Eine durch *Candida* verursachte Infektion des Blutkreislaufs kann innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Diagnose des Erregers optimal behandelt werden, wohingegen die Sterblichkeitsrate der Patienten um das Dreifache steigt, wenn die Diagnose erst nach 24 Stunden gestellt wird [10, 11]. Einer frühen und schnellen Identifikation der beteiligten Pilzspezies im Rahmen einer Infektion wird daher eine stetig wachsende Bedeutung in der medizinischen Diagnostik zuteil.

## **1.1 Humanpathogene Pilze und ihre Krankheitsbilder**

### **1.1.1 Oberflächliche Pilzinfektionen bei immunkompetenten Menschen**

Oberflächliche Mykosen (Pilzinfektionen) sind weitverbreitete Infektionskrankheiten der Haut, Haare, Nägel und Schleimhäute, unter denen weltweit 20 bis 25 % der Bevölkerung leiden [12]. Eine Infektion wird vornehmlich von Dermatophyten verursacht und erfolgt durch Körperkontakt von Mensch zu Mensch, durch Tiere und im verringerten Maße durch Pilze in der Umwelt [13]. Eine Infektion kann je nach betroffener Körperregion vielfältige Erscheinungsbilder haben. Die drei bedeutendsten Verursacher einer Dermatophytose der Haut, Haare und Nägel (Tinea) sind die Genera *Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton* [12]. Das klinische Erscheinungsbild ist in diesen Fällen auf keratinhaltiges Epithel beschränkt und manifestiert sich durch Entzündungsreaktionen, Hautrötungen, Schuppen- und Blasenbildung [14]. Eine Mykose der Schleimhäute wird meist durch Hefepilze der Gattung *Candida* verursacht und tritt beispielsweise in der Mundhöhle als weißer Belag (Soor) oder im Genitalbereich als Vaginalsoor in Erscheinung. Ein Befall durch Dermatophyten kann in gesunden Menschen aller Bevölkerungsschichten erfolgen. Im Gegensatz zu den opportunistischen Pilzinfektionen (siehe Kapitel 1.2.2) ist eine Form der Immunsuppression keine Voraussetzung, wirkt sich jedoch als prädisponierender Faktor für eine Mykose aus [15].

### **1.1.2 Invasive Pilzinfektionen und betroffene Patientengruppen**

Unter einer invasiven Pilzinfektion oder invasiven Mykose versteht man im Allgemeinen eine durch Pilze verursachte Infektionskrankheit. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen oberflächlichen Pilzinfektionen (siehe Kapitel 1.2.1) reichen diese Infektionen von einem Befall der inneren Organe bis hin zu einer Blutstrominfektion und Sepsis. Der Terminus „invasive Pilzinfektion“ war in der Vergangenheit jedoch Gegenstand begrifflicher Diskussionen [16]. Im klinischen Kontext wird der Begriff der invasiven Pilzinfektion heute eher benutzt, um eine akute, systemische Infektion mit Pilzen zu beschreiben [17].

So sind auch Dermatophyten (siehe Kapitel 1.2.1) wie *Trichophyton violaceum* in der Lage, die verhornten Schichten der Haut zu durchdringen [18]. Bereits dieser initiale Schritt resultiert in einer inflammatorischen Antwort und kann zur Produktion von Antikörpern führen, welche wiederum im Blut nachgewiesen werden können. Die Immunantwort kann für eine pathologische Gewebereaktion an entfernten und nicht infizierten Bereichen verantwortlich sein [19]. Der

Hefepilz *Candida albicans* kolonisiert häufig die weibliche Vagina, ohne dabei pathologische Symptome hervorzurufen. Unter bestimmten Umständen kann *C. albicans* das Epithel durchdringen und durch diese Invasion des Gewebes eine inflammatorische Reaktion auslösen, welche letztlich zu einer vaginalen Mykose führt [20]. Bei einer Verwendung des Terminus „invasiv“ in seinem eigentlichen Sinne könnten daher alle Infektionen durch Pilze als invasiv bezeichnet werden [16]. Eine Differenzierung zwischen Kolonisierung und einer invasiven Pilzinfektion mit abweichenden klinischen Erscheinungsformen und Folgen ist daher im klinischen Kontext der Behandlung von Patienten außerordentlich wichtig. In Verbindung mit überarbeiteten Definitionen der EORTC/MSG-Konsensus-Gruppe charakterisiert somit eine invasive Pilzinfektion eine systemische, generalisierte, tiefsitzende, viszerale und lebensbedrohliche Infektion mit Pilzen [17, 21].

Bei Pilzen als Verursacher von invasiven Mykosen handelt es sich um opportunistische Krankheitserreger. Diese pathogenen Keime verursachen Infektionen, die in einem immunkompetenten Organismus unter normalen Umständen keine Krankheit verursachen können. Einer Infektion vorausgehend liegt daher beim Patienten eine deutliche Beeinträchtigung des Immunsystems durch eine bereits ausgeprägte Erkrankung, die Folgen der Behandlung oder einen primären Immundefekt vor (siehe Tabelle 1). Ein opportunistischer Erreger zieht aus dem geschwächten Zustand des Patienten einen Nutzen und kann sich in diesem Status eher vermehren.

**Tabelle 1:** Risikofaktoren für invasive Pilzinfektionen (abgeändert nach [22] und [23])

Risikokategorie	Prädisponierende Faktoren
<b>Grunderkrankung</b>	Neutropenie Immunsuppression Diabetes mellitus Malignome Gastrointestinale Perforation APACHE-Score >20 Aufenthalt auf der Intensivstation (> 8 Tage) Akute Niereninsuffizienz Hohes Alter
<b>Medizinische Maßnahmen</b>	Antibiotikatherapie (> 2 Wochen) Chemotherapie Kortikosteroide ZVK, peripherer Venenkatheter Viszeralchirurgische Eingriffe Mechanische Beatmung (> 10 Tage) Totale parenterale Ernährung Haemodialyse
<b>Besiedelung des Patienten</b>	Kolonisierung mit <i>Candida</i> (> 2 Körperstellen)

Den bedeutendsten Risikogruppen für eine invasive Pilzinfektion gehören Patienten an, die unter einer ausgeprägten Form der Neutropenie leiden (Verminderung der neutrophilen Granulozyten im Blut auf unter  $0,5 \times 10^9/L$ ), Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen, nach allogener Stammzell- oder Organtransplantation, andauernder Behandlung mit Kortikosteroiden und Patienten, die einer Hochdosis-Chemotherapie unterzogen wurden [24, 25]. Andere Risiken für Patienten stellen zudem oftmals auch unvermeidliche medizinische Maßnahmen im Rahmen ihrer Behandlung dar, wie beispielsweise ein dauerhaft implantierter zentraler Venenkatheter (ZVK), ein verlängerter Aufenthalt auf der Intensivstation, parenterale Ernährung oder eine andauernde mechanische Beatmung [26, 27].

Eine Infektion des menschlichen Organismus mit Pilzen erfolgt meistens durch das Einatmen von Sporen über die Atemluft (Aspergillose und Kryptokokkose), die Penetration der Schleimhäute (Candidose) oder die Aufnahme von kontaminierter Nahrung [28]. Sobald ein Organ mit einem Pilz infiziert ist, kann sich diese lokale Infektion dann als disseminierte Infektionen im Körper ausbreiten. Der Krankheitsverlauf und seine Manifestation im menschlichen Körper richten sich dabei nach der Art des infizierenden Keimes. Pilze sind weitverbreitete Organismen im Erdboden, in Pflanzenrückständen und organischen Substraten. Sie umfassen mit schätzungsweise sieben Prozent aller eukaryotischen Spezies auf der Erde über 600.000 Spezies [29], wobei nur ein geringer Anteil von ungefähr 600 Spezies ein humanpathogenes Potential aufweist und in der Lage ist, invasive Mykosen zu verursachen [30].

### **1.1.3 Klinische Epidemiologie und Manifestation von invasiven Pilzinfektionen**

Im Gegensatz zu den oberflächlichen und kutanen Infektionen von Dermatophyten (siehe Kapitel 1.2.1) sind invasive Pilzinfektionen meist lebensbedrohlich. Grundsätzlich besitzt jedwede in der Umwelt präsente Pilzart ein humanpathogenes Potential in immunsupprimierten Patienten [28]. Invasive Pilzinfektionen werden oft nosokomial erworben, womit die Infektion im Zuge eines Behandlungsaufenthaltes im Krankenhaus gemeint ist [1]. Bis zu 15 Prozent aller nosokomial in medizinischen Einrichtungen erworbenen Infektionen werden momentan durch Pilze hervorgerufen, wobei die Tendenz steigend ist [31].

Hefepilze der Gattung *Candida* gehören zu den weltweit prädominierenden, humanpathogenen Pilzspezies [25] und stellen die häufigsten Erreger von invasiven Pilzinfektionen dar [6]. Eine Kolonisation der Schleimhäute durch *Candida*-Spezies ist der initiale Schritt im Zuge einer systemischen *Candida*-Infektion (Candidiasis), bevor die Keime weiter in den Blutkreislauf des Menschen oder in primär sterile Körperareale eindringen. So können *Candida*-Spezies auf bis zu 88 Prozent der mukokutanen Oberflächen von Krankenhauspatienten isoliert werden [32, 33]. Aufgrund ihrer adhärenen Eigenschaften ist *C. albicans* die am weitesten verbreitete aller

*Candida*-Spezies und wurde im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte zum meist isolierten Pathogen in immunsupprimierten Patienten [25, 33]. Die häufigste zu beobachtende klinische Erscheinungsform einer *Candida*-assoziierten Erkrankung ist dabei eine Infektion des Blutkreislaufs (Candidämie). In den letzten Jahren hat die Bedeutung von anderen *Candida*-Spezies zugenommen, da diese vermehrt im klinischen Kontext isoliert werden [34]. *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. krusei* sind andere häufige Vertreter des Genus *Candida*, wobei *C. glabrata* und *C. tropicalis* aufgrund ihrer ausgeprägten Resistenzen gegenüber gebräuchlichen Antimykotika wie Fluconazol und Itraconazol ein besonderes Risikopotential in sich tragen [35-38].

Der Hefepilz *Cryptococcus neoformans* ist ein bedeutender Erreger der Kryptokokkose und wird zunehmend in immunsupprimierten Patienten nachgewiesen [39, 40]. Eine Infektion mit *C. neoformans* erfolgt meist über die Inhalation der Sporen und wird vermehrt als AIDS-assoziierte Krankheit bemerkt [41]. Die Pilze können neben Infektionen der Haut, der Weichgewebe und der Augen vor allem schwere Formen der Meningitis hervorrufen [39].

Infektionen verursacht durch Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* können zu hochgradig lebensbedrohlichen Formen der invasiven Aspergillose führen [42], wobei *A. fumigatus* der bedeutendste Erreger in hämatologischen und onkologischen Patienten ist [43]. Weitere regelmäßig isolierte *Aspergillus*-Spezies sind *A. flavus*, *A. niger* und *A. terreus* [5]. Die klinischen Krankheitsbilder einer Aspergillose variieren je nach dem Immunstatus des betroffenen Patienten und der infizierten Regionen. Die Infektion erfolgt meist über die Atemluft durch Inhalation der Sporen [44]. Im Fall der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) kann bereits eine Kolonisation der Bronchen mit *Aspergillus*-Myzelien eine hypersensitive Reaktion und somit eine allergische Erkrankung der Lunge verursachen, welche sich vornehmlich in Patienten mit Asthma und zystischer Fibrose manifestiert [45]. *Aspergillus*-Infektionen werden in über 90 Prozent aller Diagnosen auf einen Befall der Atemwege zurückgeführt, welcher insbesondere bei Patienten mit Leukämie zu beobachten ist [46]. Die Mortalitätsraten von invasiven pulmonalen Aspergillosen und Infektionen des Zentralen Nervensystems reichen in immunsupprimierten Patienten von 40 bis 90 Prozent und werden in Empfängern einer Stammzelltransplantation sogar mit einer Letalität von bis zu 95 Prozent beschrieben [44].

Im Verlauf der letzten Jahre offenbarte eine steigende Anzahl an Berichten die klinische Relevanz von seltenen und neu auftretenden pathogenen Pilzen mit einem großen Gefährdungspotential für immunsupprimierte Patienten [47-49]. *Fusarium* spp. verursachen eine weite Bandbreite an schweren Infektionen und stellen aufgrund ihrer Resistenz gegenüber gebräuchlichen Antimykotika wie Fluconazol, Itraconazol, Caspofungin und Anidulafungin ein hohes Risiko dar [50, 51]. Patienten, die eine ausgedehnte Phase der Neutropenie durchlaufen oder unter hämatologischen Erkrankungen leiden, weisen das höchste Risiko auf, an einer invasiven Fusariose zu erkranken [52, 53]. Auch hier stellen die Atemwege oder Verletzungen der (Schleim-)Haut meist die Eintrittspforte dar. Disseminierte *Fusarium*-Infektionen nehmen einen schwerwiegenden Verlauf und erreichen Mortalitätsraten von bis zu 100 Prozent [53].



*Scedosporium prolificans* ist ein pathogener Schimmelpilz, welcher zunehmend als Ursache für Infektionen in immunsupprimierten Patienten wahrgenommen wird [54, 55]. Ähnlich wie bei den *Fusarium*-Spezies zeichnet ihn ein breites Resistenzspektrum gegenüber den Antimykotika Fluconazol, Itraconazol, Caspofungin und Anidulafungin sowie zusätzlich Amphotericin B aus, was zu einer großen Herausforderung im Zuge der Behandlung führt und die Bedeutung einer frühen Diagnose hervorhebt [56].

Ein auffälliger Anstieg an *Trichosporon*-Infektionen konnte im Verlauf der letzten Jahre festgestellt werden [57, 58]. Im Rahmen des ARTEMIS-Programms – einem Überwachungs- und Untersuchungsprogramm für humanpathogene Pilze – stellte *Trichosporon* den dritthäufigsten Nicht-*Candida*-Hefepilz in den klinischen Materialien der teilnehmenden Laboratorien dar [59]. Der Pilz kommt im Frischwasser sowie im Erdboden vor und stellt einen natürlichen Teil der menschlichen Hautflora sowie der Flora des gastrointestinalen Traktes dar. Zu den wichtigsten Verursachern einer durch Infektion mit *Trichosporon* ausgelösten Trichosporonose gehören *T. asahii*, *T. inkin*, *T. cutaneum*, *T. ovoides* und *T. mucoides*. Das häufigste Erscheinungsbild einer invasiven *Trichosporon*-Infektion ist eine Fungämie (Infektion des Blutkreislaufes mit Pilzen), welche in immunsupprimierten Patienten eine hohe Letalität aufweist [60]. *Trichosporon*-Infektionen werden vornehmlich in Patienten mit akuten Leukämien und hämatologischen Erkrankungen beobachtet [61], sowie in Patienten, die eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) erhalten hatten [62].

Der Schimmelpilz *Penicillium* ist in der Natur weitverbreitet und wurde in der Vergangenheit in erster Linie als ein häufiger Kontaminant in klinischen Materialien wahrgenommen [63, 64]. Nur selten wurden diese Pilze als ein konkreter Krankheitserreger verstanden. Mit der stetig wachsenden Population an immunsupprimierten Patienten mehrten sich jedoch auch Berichte von Infektionen durch *Penicillium*-Spezies. *Penicillium marneffe* stellt die am häufigsten isolierte Spezies dar und ruft vor allem bei AIDS-Patienten disseminierte Infektionen hervor [65, 66]. Bei immunsupprimierten Patienten mit hämatologischen Erkrankungen ruft *Penicillium* in erster Linie schwere pulmonale Infektionen hervor, die oftmals einen lethalen Verlauf nehmen [67, 68].

Zygomycosen sind durch einen aggressiven und schnellen Krankheitsverlauf charakterisiert und gehören zu den tödlichsten opportunistischen Pilzinfektionen [69]. Eine Infektion durch Sporen von Zygomyceten erfolgt über die Nasennebenhöhlen und Schleimhäute, tritt jedoch nur bei schwer immunsupprimierten Patienten auf. In diesen Risikopatienten verursachen oftmals späte und unzureichende Diagnosen, die mit einer Zygomyceten-Infektion des ZNS einhergehen, sowie das breite Resistenzspektrum eine hohe Mortalitätsrate [70]. Bis zu 80 Prozent aller registrierten Mucormykosen werden durch Spezies der *Rhizopus*-, *Mucor*- und *Lichtheimia*- (früher der Gattung *Absidia* zugehörig) Genera verursacht [71, 72]. Die Gattung *Lichtheimia* wurde durch eine Revision der *Absidia*- und *Mycocladius*-Genera auf Grundlage von phylogenetischen und morphologischen Charakteristika definiert [73, 74]. Die Gattungen *Absidia*, *Rhizomucor* und *Cunninghamella* stellen weitere wichtige Vertreter der Ordnung Mucorales dar, welche für ernstzunehmende Pilzinfektionen in immunsupprimierten Patienten verantwortlich sind [75, 76].

## 1.2 Diagnostik von Pilzinfektionen

Je nach Art des Pilzes und der klinischen Manifestation des Krankheitsbildes sind die im Folgenden erläuterten, in vielen Kliniken und Laboratorien etablierten Untersuchungsmethoden unterschiedlich gut geeignet, eine spezifische Diagnose zu stellen. Die Erkennung von invasiven Pilzinfektionen beruht daher im Allgemeinen auf der Kombination von mehreren Untersuchungsmethoden und -parametern [77]. Einen ersten Indikator für eine Pilzinfektion liefern dabei klassische klinische Symptome wie Fieber, Hämoptyse sowie Schmerzen und Beschwerden beim Atmen. Diesen Anzeichen für eine aufkeimende Infektion schließt sich schnellstmöglich eine Diagnostik zur Bestimmung des Keimes an, die häufig auf einer Kombination von mehreren Befunden aus mikrobiologischen, radiologischen und serologischen Analysen basiert.

### 1.2.1 Klassische Diagnostik-Verfahren

Konventionelle mykologische Untersuchungsmethoden beinhalten die direkte mikroskopische Untersuchung von klinischen Proben und Kulturanzuchten. Die Kultivierung und Mikroskopie von klinischen Proben wie Sputum, Urin, Rückenmarksflüssigkeit, Gewebebiopsien oder Blut stellt den Goldstandard in der Diagnose von invasiven Pilzerkrankungen dar [1, 78, 79]. Der direkte Nachweis von Pilzen in primär sterilen Proben gilt als gesicherter Beweis einer Infektion. Die histopathologische Untersuchung von Gewebebiopsien wird beinahe immer in Kombination mit einer parallelen Kulturanzucht durchgeführt. Für eine kulturelle Anzucht von Pilzen stehen unterschiedliche Spezialnährmedien und Färbemittel zur Verfügung. Die Pilze werden anhand ihrer Größe und morphologischen Erscheinung charakterisiert, was oftmals eine nur deskriptive Beschreibung und Diagnose erlaubt [80].

Obwohl die mikroskopische und kulturelle Diagnostik als Goldstandard zum Nachweis von Pilzinfektionen gilt, ist diese Diagnostik limitiert. Die Effizienz der mikroskopischen Untersuchung zur Diagnose von Pilzinfektionen variiert im verstärkten Maße mit den nachzuweisenden Pathogenen, dem Ursprung und der Qualität der Proben sowie den Fähigkeiten und der Erfahrung des Personals [79]. So können während einer Infektion mit Zygomyceten die Pilze während der Homogenisierung des Gewebes ihre Viabilität verlieren und die Kultivierung erschweren [81]. Sollen die klinischen Proben von Patienten entnommen werden, die aufgrund ihrer Primärerkrankung oder Behandlung einer prophylaktischen antifungalen Therapie unterzogen werden, ist die Gefahr, falsch-negative Ergebnisse zu erzielen, besonders hoch [28, 82]. Verschiedene Studien berichteten bei Blutkulturen zur Bestimmung einer Candidiasis von bis zu 50 Prozent negativen Testergebnissen, obwohl eine dokumentierte Erkrankung vorlag [31, 83].

Die Erstellung von mehreren Blutkulturen ist daher notwendig. Im Fall einer invasiven Aspergillose sind positive Blutkulturen aufgrund der nicht optimalen Kulturbedingungen selten und werden meist als Kontamination eingestuft [84]. Die direkte Mikroskopie und Histopathologie zum Nachweis von invasiven Pilzinfektionen setzt die Verwendung von Gewebebiopsien voraus. Deren Entnahme stellt für Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und Stammzelltransplantationen ein nicht zu unterschätzendes Risiko dar aufgrund der Thrombozytopenie und der potentiellen Gefahr von Blutungskomplikationen [85].

Ein Nachteil der kulturellen Anzucht ist der benötigte Zeitaufwand. Kulturen können ein bis drei Tage benötigen, bis ein Wachstum zu erkennen ist. Zusätzlich werden ein bis zwei weitere Tage für eine abschließende Identifikation der Pilzart benötigt [86]. Die Auswirkungen solch einer Verzögerung bis zur Behandlung von invasiven Mykosen können mitunter verheerend sein und eine erhöhte Mortalitätsrate nach sich ziehen, da selbst innerhalb einer Pilzfamilie unterschiedliche Resistenzen gegenüber Antimykotika existieren [87].

Bildgebenden Verfahren kommt eine entscheidende Rolle in der Diagnose von invasiven Pilzinfektionen zu. Aufgrund ihrer höheren Sensitivität und Spezifität überwiegen die Vorteile der hochauflösenden Computertomographie (HRCT) deutlich gegenüber denen der herkömmlichen Röntgenaufnahmen des Thorax. Die HRCT liefert oft wichtige Hinweise für eine klinische Behandlung von Patienten mit Anzeichen einer pulmonalen Pilzinfektion [88]. Die Diagnose von pulmonalen Infektionen (wie z. B. einer Aspergillose, Fusariose, Scedosporiose oder Zygomycose) beruht im besonderen Maße auf dieser Form der Diagnostik [89, 90]. Die Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglicht die Beurteilung von Patienten mit einer invasiven fungalen Sinusitis [91] und eignet sich zudem in Verbindung mit Gadolinium-Kontrastmitteln zur Visualisierung einer Infektion des Zentralen Nervensystems [92]. Ein ernst zu nehmender Nachteil der bildgebenden Verfahren ist das einhergehende potentielle Risiko der Strahlenbelastung, welches vor allem bei Kindern berücksichtigt werden muss [93]. Zudem ist bei Kindern eine geringere Spezifität dieser Methoden im Vergleich zu erwachsenen Patienten zu beobachten [94]. Ein generelles Problem der bildgebenden Verfahren ist letztendlich die Unmöglichkeit, die infizierende Pilzspezies zu identifizieren, da jene lediglich das Vorhandensein von Infiltraten aufzeigen können.

Serologische Tests basieren auf dem Nachweis von spezifischen Pilz-Antikörpern und -Antigenen. Die verfügbaren und aktuell genutzten Methoden für serologische Untersuchungen umfassen Enzym-Immunoassay (EIA), Immunodiffusion (ID) und Komplementbindungsreaktion („complement fixation“; CF) [79]. Neben den kulturellen Verfahren liefern diese Methoden wichtige Informationen für die Diagnose von Pilzinfektionen [79, 84].

Galactomannan (GM) ist ein Polysaccharid, das in den Zellwänden von *Aspergillus*-Spezies vorkommt. Das bei einer *Aspergillus*-Infektion im Blut zirkulierende Galactomannan wird für die Diagnose einer invasiven Aspergillose genutzt [85]. Beeinflussende Faktoren für die Effizienz des Testverfahrens sind die Effekte einer antifungalen oder antibakteriellen Prophylaxe. So kann bei einer Antibiotikatherapie mit Penicillinen ein hohes Maß an falsch-positiven Testergebnissen

beobachtet werden [86]. Zudem kann Galactomannan auch als Zellbestandteil von *Histoplasma*- und *Fusarium*-Spezies gefunden werden, wodurch eine Diagnose durch ungewünschte Kreuz-Reaktivitäten verfälscht wird [31, 83].

Mannan ist ein Glykoprotein und charakteristischer Bestandteil von Hefepilzen. Die Detektion von zirkulierenden *Candida*-Mannan- und -Anti-Mannan-Antikörpern dient als diagnostisches Verfahren zur Identifikation einer invasiven Candidiasis oder Candidämie [28, 95].

(1→3)- $\beta$ -D-Glucan (BDG) ist ein Polysaccharid-Bestandteil der Zellwand von Spross- und Fadenpilzen und ist im Verlauf einer Pilzinfektion im Blut nachweisbar [78]. Es kann in Seren von Patienten gefunden werden, die unter einer invasiven Candidiasis, Aspergillose oder Fusariose leiden, und zeichnet sich aufgrund dessen nicht als spezifischer Marker aus [81, 96]. Die Detektion von *Cryptococcus*-Spezies und Zygomyceten ist durch ein BDG-Assay nicht möglich. Außerdem erhöhen aus Cellulose hergestellte Dialysefilter oder Labormaterialien die Konzentration von  $\beta$ -Glucan im Serum, was zu falsch-positiven Testergebnissen führen kann [82].

Ein entscheidender Nachteil der serologischen Methoden ist die späte Verfügbarkeit von Untersuchungsergebnissen, da einige Tests wie die Komplementbindungsreaktion (Test zum Nachweis von Antikörpern im Blutserum) zeitintensive Verfahren darstellen. Bei akuten Infektionen ist ein solcher Zeitverzug mit schwerwiegenden Folgen verbunden, da sich eine passende Behandlungsstrategie nur spät formulieren lässt. Zudem ist die Differenzierung, ob eine Besiedlung des Patienten vorliegt oder eine konkrete Infektion vorherrscht, problematisch, da selbst im Falle einer Besiedlung Antikörper nachzuweisen sind. Ob vorhandene Antikörper eine gegenwärtige oder vorangegangene Infektion beschreiben, ist ein weiterer erschwerender Faktor bei der Interpretation von Testergebnissen. Bei immunsupprimierten Patienten kann zudem eine reduzierte Antikörper-Antwort beobachtet werden [97]. Ein negatives Testergebnis schließt in diesen Szenarien daher nicht zwingend eine Pilzinfektion aus.

## **1.2.2 Molekularbiologische Diagnostik von Pilzen**

Die Weiterentwicklungen der antimykotischen Therapie- und Behandlungsoptionen im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte stehen im starken Kontrast zu den wenigen Neuerungen in der Diagnostik von invasiven Pilzinfektionen. Aufgrund des überaus großen Gefahrenpotentials von invasiven Pilzinfektionen wurden sowohl Prophylaxe als auch die konkreten Behandlungsschemata stetig optimiert. Die diagnostischen Verfahren stützen sich jedoch vornehmlich auf die bereits etablierten Methoden [1, 78, 79]. Die Äußerung eines anfänglichen Verdachts einer Infektion anhand von klinischen Symptomen verbleibt unspezifisch, da erste Indikatoren wie beispielsweise Fieber und Husten nicht zwangsläufig mit einer Pilzinfektion gleichzusetzen sind. Eine Diagnostik für die schnelle und eindeutige Bestimmung einer

potentiellen Infektion und der beteiligten Erreger ist daher von großer Bedeutung. Die konventionellen Diagnostik-Verfahren wie Kultivierung, Histologie, bildgebende Verfahren und Serologie besitzen unterschiedliche Defizite im Hinblick auf ihre Spezifität, Sensitivität, ihren Zeiteinsatz und geeignete Probenmaterialien. Das molekularbiologische Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) repräsentiert ein leistungsfähiges Werkzeug für die schnelle und sensitive Diagnose von Pilzinfektionen in klinischen Proben.

Obwohl die PCR-basierte Diagnostik das Potential in sich trägt, die Diagnose von invasiven Pilzinfektionen zu verbessern, ist sie in vielen Laboratorien nicht etabliert. Grund hierfür ist die mangelnde Standardisierung der molekularbiologischen Verfahren. Zudem herrscht immer noch ein Mangel an vollständig evaluierten und bewerteten kommerziellen Systemen für viele Pilzfamilien und -spezies [78, 86, 96]. Diese Faktoren führten zu dem Umstand, dass die PCR-Analyse nicht in die 2008 von der EORTC- und MSG-Konsensus-Gruppe verfassten Kriterien für die Diagnose von invasiven Pilzinfektionen miteinbezogen wurde [21]. Seitdem wurde der große Wert der PCR-Diagnostik für Pilzinfektionen in zahlreichen Studien unter Beweis gestellt [78, 96, 98].

Während der letzten Jahre wurde eine Vielzahl an PCR-Assays publiziert, deren praktische Umsetzung sich in vielen Gesichtspunkten unterscheidet. Die einfachste technische Herangehensweise beruht auf der konventionellen PCR, bei der speziesspezifische Primer die DNA von Pilzen aus klinischen Proben amplifizieren. Eine Auswertung erfolgt anhand einer Agarose-Gelelektrophorese und Beurteilung der Banden. Weiterführende und komplexere technische Ansätze von angewandten PCR-Assays sind Nested-PCRs [99, 100], PCR in Kombination mit einer FRET-Detektion (Förster-Resonanzenergietransfer) [101], konventionelle PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung [102], PCR-Läufe gekoppelt mit Massenspektrometrie [103, 104] und quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) [105]. Realtime-PCR-Verfahren machen sich die Eigenschaften von fluoreszenten Farbstoffen zunutze, entweder in Form eines nicht spezifischen, an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoffes wie SYBR Green oder aber durch sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden.

Im klinischen Kontext ist eine breite Vielfalt an pathogenen Pilzen bekannt (siehe Kapitel 1.1). Die meisten PCR-Assays fokussieren sich jedoch auf die Detektion eines einzelnen Pilz-Genus, wie beispielsweise *Aspergillus* [106, 107] und *Candida* [99, 108] oder spezialisieren sich sogar auf die Identifikation einer einzelnen Spezies [109, 110]. Einige Verfahren konnten erfolgreich Duplex-PCR-Assays für die Detektion von zwei Pilzpathogenen entwickeln [111, 112] oder nutzen Multiplex-PCR-Lösungen für eine multiple Anzahl an Pilz-Genera [104, 112].

Weitere Unterschiede in der Realisierung von PCR-Assays lassen sich in der Art der klinischen Probe finden (Serum, Blut, BAL oder Gewebebiopsien), in den Methoden der DNA-Isolierung sowie den amplifizierten Zielgenen [100, 112, 113]. Als molekulare Zielregion wurden in der Vergangenheit verschiedene Gene beschrieben, wie z. B. Gene für die Lysin-Biosynthese [114] oder aber mitochondriale Gene [115]. Am weitesten verbreitet sind jedoch Methoden, die sich die ribosomale DNA (rDNA) als Zielregion zu eigen machen (siehe Kapitel 3.1).

### **1.3 Zielsetzung der Dissertation**

Im Rahmen dieser Dissertation sollten Pilze mit PCR-basierten Methoden identifiziert werden, die ein großes Gefährdungspotential für immunsupprimierte, hämatologische Patienten aufweisen, da sie schwerwiegende opportunistische Pilzinfektionen verursachen können. Die Konzipierung einer neuartigen und umfassenden fungalen PCR-Diagnostik (fuPCR) sollte eine schnelle und simultane Detektion und Differenzierung dieser medizinisch relevanten Pilzspezies in klinischen Materialien (Rachenabstrich, EDTA-Blut und Blutserum) von Hochrisiko-Patienten ermöglichen. Nach Identifikation einer geeigneten Zielregion für die fuPCR sollte ein Set an genus- und zweigspezifischen Primerpaaren für die Differenzierung der Pilze entwickelt werden. Eine universelle Pan-PCR sollte als Backup-Reaktion und zur Erfassung von bisher unbekanntem und neu in Erscheinung tretenden Pilzen dienen. Zudem sollte die fuPCR an klinischen Proben von hämatologischen Patienten getestet und die erzielten Ergebnisse mit den Daten der konventionellen Pilzkultivierung verglichen werden.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2:** Auflistung aller genutzten Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Parafilm M	American National Can, USA
Nitra-Tex Micro-Touch Nitrile Examination Gloves M	Ansell
Kanülen-Sterican	Braun, Wertheim
Einmal-Injektions-Kanüle Gr. 1 Ø 90 x 40mm	Braun, Wertheim
Objektträger geschnitten 76 x 26 mm	Engelbrecht
Cellstar Tubes 15 ml, PP	Greiner Bio-one
Inoculator Needle 200 mm	Greiner Bio-one
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
Combitips PLUS (0,5 & 1,0 ml)	Original Eppendorf
Precellys Ceramic Kit 0,5 mm	Peqlab
Precellys Ceramic Kit 2,8 mm	Peqlab
Tube 50 ml, 114 x 28 mm, PP	Sarstedt
Biosphere Filter Tips (20 bis 1000 µl)	Sarstedt
Impfeschlingen 10 ul	Sarstedt
Latex Powder-Free Latexhandschuhe M7-8	Sempermed
TipOne Graduated Filter Tip (10 bis 1000 µl)	Starlab
Deckgläschen	VWR, Darmstadt
Nunc CrypTube Vials (1,8 bis 4,5 ml)	Nunc
PCR Stripes EU 0.1 ml 8-tube strip	BIOplastics
SafeLock Tubes (0,5 & 2,0 ml)	Eppendorf
SafeSeal Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt

## 2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Antibiotika

In der folgenden Tabelle 3 sind wichtige in der Arbeit verwendete Chemikalien, Enzyme und Antibiotika mit entsprechenden Bezugsquellen aufgelistet.

**Tabelle 3:** Auflistung der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	Biozym, Oldendorf
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	Life Technologies, Carlsbad, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	VWR International GmbH, Radnor, USA
Kartoffel-Dextrose-Agar	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Malz-Extrakt	Neogen, Auchincruive, UK
Massruher DNA-Ladder Mix	Thermo Scientific, Braunschweig
MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay NO Rox	Eurogentec, Seraing, Belgien
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Radnor, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
Proteinase K Solution	Qiagen, Hilden
qPCR Master Mix No Rox	Eurogentec, Seraing, Belgien
Sabouraud-2%-Glucose-Bouillon	Roth, Karlsruhe
Sabouraud-Agar	Roth, Karlsruhe
Reisagar	BD Life Sciences, Heidelberg
Takyon No ROX Probe MasterMix dTTP	Eurogentec, Seraing, Belgien
Takyon No ROX Probe MasterMix UNG	Eurogentec, Seraing, Belgien
Tween 20	Merck, Darmstadt
Zymolyase 100T	Amsbio, Cambridge, USA

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Serva, Sigma oder Roth in pA-Qualität bezogen.



### 2.1.3 Geräteverzeichnis

In diesem Kapitel werden alle Gerätschaften aufgelistet, die im Zuge der Dissertation genutzt wurden (siehe Tabelle 4). Neben den hier erwähnten Apparaturen wurden zudem Geräte verwendet, welche zur standardmäßigen Ausstattung eines naturwissenschaftlichen Laboratoriums gehören, wie beispielsweise Analysewaagen, Vortex-Schüttler, Heizblöcke, Reinstwasseranlage, Wasserbäder, Brut- und Inkubationsräume.

**Tabelle 4:** Auflistung aller verwendeten Geräte und Apparaturen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Bio Robot EZ1	Qiagen
BioDocAnalyse Gel-Dokumentationssystem	Biometra
CFX 96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
miniSpin Ultrazentrifuge	Eppendorf
MR3001 K Magnetrührer	Heidolph
Multipette Plus	Eppendorf
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences
Power Pack P25 Spannungsquellen	Biometra
Precisa 400 Feinwaage	Oehmen Labortechnik
PS 500 XT Spannungsquellen	HIS
sprout Tischzentrifuge	Kisker Biotech
Tgradient PCR Cycler	Biometra
Thermomixer Comfort Heizblock	Eppendorf
Thermoschüttler 5436	Eppendorf
Vitek MS	BioMérieux
Workbench Antair BSK	Antair
Workbench Safe 202	Thermo Scientific

### 2.1.4 Kits

**Tabelle 5:** Auflistung aller verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
Qiagen DNeasy Blood & Tissue Set	Qiagen, Hilden
NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up	Machery-Nagel, Düren
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Qiagen, Hilden

### 2.1.5 Pufferlösungen

Die während der Dissertation verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt und wurden mit hochreinem Wasser aus der institutseigenen Wasseraufbereitungsanlage MilliQ Synthesis A10 hergestellt, welches im Folgenden als dH<sub>2</sub>O bezeichnet ist.

**Tabelle 6:** Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Erythrozyten Lysis-Puffer [ELB]	10 mM Tris/HCl [pH 7.6] 5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM NaCl
Zymolyase Lösung	50 mM Tris [pH 7.6] 1 mM EDTA [pH 8.0] 0,2% 2-mercaptoethanol 30 U Zymolyase
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4

## 2.1.6 Kulturmedien

Alle verwendeten Kulturmedien wurden gemäß den Herstellerangaben hergestellt. Die Medien wurden vor Gebrauch bei 121 °C für 20 min autoklaviert und anschließend im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt. Der Agar wurde in sterile Petrischalen gegossen (15 ml pro Schale) oder in sterile Reagenzglasröhrchen als Schrägagar (6 ml pro Röhrchen) gefüllt.

### Kartoffel-Dextrose-Agarplatten

---

Kartoffel-Dextrose-Agar wurde zur Kurzzeitkultivierung von Schimmelpilzen genutzt. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Kartoffel-Dextrose-Agar	39,0 g
Siedesteine	5
dH <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml
pH	5,4 - 5,8

### LB-Agarplatten

---

Standard-Medium zur Kultivierung von Schimmel- und Hefepilzen. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

LB-Agar	40,0 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml
pH	7,0

### Malz-Agarplatten

---

Dieses Medium wurde zur Kurzzeitkultivierung von Schimmel- und Hefepilzen verwendet. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Agar-Agar	15,0 g
Malz-Extrakt	15,0 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml
pH	4,5 - 5,7

**Reis-Agarplatten**

---

Reisagar wurde zur Kurzzeitkultivierung von Hefepilzen verwendet. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Reisagar	25,0 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml

**Sabouraud-Agarplatten**

---

Dieses Medium wurde zur Kurzzeitkultivierung von Pilzen verwendet. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Sabouraud-Agar	47,0 g
Siedesteine	4
dH <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml
pH	5,4 - 5,8

Um eine Kontamination mit Bakterien zu vermeiden, wurden dem Medium zusätzlich Chloramphenicol und Streptomycin hinzugefügt. Die Antibiotika wurden bedingt durch die Thermolabilität erst nach dem Autoklavieren des Mediums zugesetzt.

Chloramphenicol	0,04 g
Streptomycin	0,04 g

**Sabouraud-Bouillon**

---

Dieses Flüssigmedium wurde zur längerfristigen Lagerung von Pilzen in Flüssigkultur bei 2 bis 8 °C verwendet. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Sabouraud-2% Glucose Bouillon	30,0 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml
pH	5,4 - 5,8

## **2.1.7 Organismen**

### **2.1.7.1 Verwendete Pilzstämme**

Für die in dieser Dissertation beschriebenen Experimente wurden Pilz-Subkulturen von validierten Referenzstämmen verwendet (siehe Tabelle 7). Die Referenzstämme wurden von der American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA), der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig, Deutschland) sowie der INSTAND e.V. (Düsseldorf, Deutschland) bezogen. Zusätzlich wurden klinische Pilz-Isolate aus dem Diagnostik-Laboratorium des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene (Universitätsklinikum Düsseldorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die klinischen Isolate wurden im Zuge der diagnostischen Routine-Untersuchungen von mikrobiologischen Patientenproben gewonnen und anhand von Standardmethoden (Kultivierung, Mikroskopie und Massenspektrometrie) identifiziert.

**Tabelle 7:** Auflistung der verwendeten klinischen Isolate und Referenzstämme

Genus	Spezies	Ursprung	Optimales Kulturmedium
<b>Absidia</b>	<i>A. glauca</i>	DSM 811	Kartoffel-Dextrose, Malz
<b>Aspergillus</b>	<i>A. flavus</i>	Instand (RV2 St. 4/06)	Sabouraud
	<i>A. fumigatus</i>	Isolat (VK 50349) <sup>b</sup>	Sabouraud
	<i>A. niger</i>	Instand (RV3/F4)	Sabouraud
	<i>A. novofumigatus</i>	Instand (RV St. 5)	Sabouraud
	<i>A. terreus</i>	Instand (RV1/I9)	Sabouraud
	<i>A. versicolor</i>	Instand (RV St. 4)	Sabouraud
<b>Candida</b>	<i>C. albicans</i>	Instand (RV3 St. C/10)	Sabouraud, Reisagar
	<i>C. dubliniensis</i>	Instand (St. 2/06)	Sabouraud, Reisagar
	<i>C. glabrata</i>	Instand (RV3 St. D/10)	Sabouraud, Reisagar
	<i>C. krusei</i>	Instand (ST. 3/07)	Sabouraud, Reisagar
<b>Cunninghamella</b>	<i>C. bertholletiae</i>	Isolat (VK 25528P) <sup>b</sup>	Sabouraud
<b>Cryptococcus</b>	<i>C. neoformans</i>	Instand (RV2 St. 1/09)	Sabouraud
<b>Fusarium</b>	<i>F. fujikuroi</i>	Instand (St. 1/10)	Kartoffel-Dextrose, Malz
	<i>F. oxysporum</i>	Instand (RV ST.4/2013)	Kartoffel-Dextrose, Malz
	<i>F. solani</i>	ATCC 36031	Kartoffel-Dextrose, Malz
<b>Lichtheimia</b>	<i>L. corymbifera</i>	DSM 1144	Kartoffel-Dextrose, Malz
<b>Mucor</b>	<i>M. circinelloides</i>	Instand (RV2/H8)	Sabouraud
	<i>M. racemosus</i>	DSM 5266	Sabouraud
<b>Penicillium</b>	<i>P. chrysogenum</i>	Isolat (VK 2317) <sup>b</sup>	Kartoffel-Dextrose, Malz
	<i>P. commune</i>	Isolat (VK 773) <sup>b</sup>	Kartoffel-Dextrose, Malz
	<i>P. crustosum</i>	Isolat (VK 31774) <sup>b</sup>	Kartoffel-Dextrose, Malz
	<i>P. funiculosum</i>	Isolat (VK 48663) <sup>b</sup>	Kartoffel-Dextrose, Malz
	<i>P. janthinellum</i>	Isolat (Vk5015) <sup>b</sup>	Kartoffel-Dextrose, Malz
<b>(Talaromyces)<sup>a</sup></b>	<i>P. marneffeii</i>	Isolat (VO20125) <sup>b</sup>	Kartoffel-Dextrose, Malz
	<i>P. spinolosum</i>	Instand (RV2 St. 3/09)	Kartoffel-Dextrose, Malz
<b>Rhizomucor</b>	<i>R. pusillus</i>	DSM 1331	Sabouraud
<b>Rhizopus</b>	<i>R. microsporus</i>	Instand (St. 1/08)	Sabouraud
	<i>R. oryzae</i>	DSM 854	Sabouraud
<b>Scedosporium</b>	<i>S. prolificans</i>	Instand (RV3 St. 2/10)	Sabouraud
<b>Trichosporon</b>	<i>T. inkin</i>	Instand (St. 3.1/08)	Sabouraud
	<i>T. mucoides</i>	Instand (St. 3.2/08)	Sabouraud
	<i>T. mycotoxinivorans</i>	Instand (RV ST.5/2013)	Sabouraud

<sup>a</sup> Synonyme Bezeichnung von *P. marneffeii*.<sup>b</sup> Klinisches Isolat aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene.

### 2.1.7.2 Bakterienstämme

Für die Klonierung von PCR-Amplifikations-Kontrollen (siehe Kapitel 2.3.5) wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet (siehe unten). Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+) $\lambda$ -

### 2.1.7.3 Plasmidvektor

Für die Klonierung von PCR-Amplifikations-Standards (siehe Kapitel 2.3.5) wurde das linearisierte Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T der Firma Promega als Vektorsystem verwendet. Die PCR-Produkt-tragenden Plasmide wurden in den Bakterienstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  propagiert.

### 2.1.7.4 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte gentechnisch veränderte Organismen

In Tabelle 8 sind alle in dieser Arbeit generierten gentechnisch veränderten Organismen aufgelistet. Als Insert für jedes Plasmid wurde ein PCR-Fragment der ITS2-Region der ribosomalen DNA gewählt. Der Name des Inserts bezieht sich auf die verwendeten Forward- und Reversprimer, die zur Generierung des DNA-Abschnittes genutzt wurden. Als Empfänger wurde *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet (siehe Kapitel 2.1.7.2).

**Tabelle 8:** Auflistung der hergestellten gentechnisch veränderten Organismen

Bezeichnung	Spender-Organismus	Insert	Insert-Größe bp
p_Cber_2	<i>Cunninghamella bertholletiae</i> SP 8749	Abs2 + ITS4.2	338
p_Cber_1	<i>Cunninghamella bertholletiae</i> SP 8749	Abs2 + ITS4.2	338
p_Mcir_1	<i>Mucor circinelloides</i> RV 2	Muc1b + ITS4.2	299
p_Mcir_2	<i>Mucor circinelloides</i> RV 2	Muc1b + ITS4.2	299
p_Cneo_1	<i>Cryptococcus neoformans</i> RV 2	Cry1 + ITS4.2	257
p_Cneo_2	<i>Cryptococcus neoformans</i> RV 2	Cry1 + ITS4.2	257
p_Spro_2	<i>Scedosporium prolificans</i> RV 3	Sce1 + ITS4.2	170
p_Afla_2	<i>Aspergillus flavus</i> RV 1	AspF + ITS4.2	243
p_Pmar_2	<i>Penicillium marneffeii</i> RV 2	AspPenF1 + ITS4.2	228
p_Rpus_2	<i>Rhizomucor pusillus</i> RV 2	Muc3 + ITS4.2	295
p_Lcor_2	<i>Lichtheimia corymbifera</i> DSM 1144	Lic1 + ITS4.2	272
p_Tink_2	<i>Trichosporon inkin</i> RV 2	Tri1 + ITS4.2	254
p_Fsol_2	<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031	Fus2 + ITS4.2	134
p_Agla_2	<i>Absidia glauca</i> DSM 811	Abs2 + ITS4.2	318
p_Rory_2	<i>Rhizopus oryzae</i> DSM 854	Muc2b + ITS4.2	306
p_Mcir_3	<i>Mucor circinelloides</i> RV 2	Muc1b + ITS4.2	299
pCgla_1	<i>Candida glabrata</i> RV3	CanF + ITS4.2	310
pCgla_4	<i>Candida glabrata</i> RV3	CanF + ITS4.2	310
pCkru_1	<i>Candida krusei</i> RV1	CanF + ITS4.2	235
pCkru_5	<i>Candida krusei</i> RV1	CanF + ITS4.2	235
pCdub_1	<i>Candida dubliniensis</i> RV2	CanF + ITS4.2	232
pCdub_2	<i>Candida dubliniensis</i> RV2	CanF + ITS4.2	232
pAter_1	<i>Aspergillus terreus</i> RV1	CanF + ITS4.2	251
pAter_2	<i>Aspergillus terreus</i> RV1	CanF + ITS4.2	251
pAfla_12	<i>Aspergillus flavus</i> RV1	AspF + ITS4.2	243
pAfla_13	<i>Aspergillus flavus</i> RV1	AspF + ITS4.2	243
pAnig_2	<i>Aspergillus niger</i> RV2	AspF + ITS4.2	243
pAnig_4	<i>Aspergillus niger</i> RV2	AspF + ITS4.2	243
pAfum_1	<i>Aspergillus fumigatus</i> VK50349	AspF + ITS4.2	242
pAfum_3	<i>Aspergillus fumigatus</i> VK50349	AspF + ITS4.2	242

### 2.1.8 Klinisches Probenmaterial und Ethikvotum

Allen in die Studie aufgenommenen Probanden wurden im Vorfeld detaillierte Informationen zum Hintergrund, Aufbau und Ziel dieser Studie überreicht. In Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki [116] wurde von jedem Teilnehmer eine schriftliche Zustimmung eingeholt, an dieser Studie teilzunehmen. Das Studienprotokoll für die Identifikation, Surveillance und Epidemiologie



von pathogenen Pilzen in immunsupprimierten Patienten wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf genehmigt (Studien-Nummer: 4146). Während dieser Studie wurden EDTA-Blut, Blutserum und Rachenabstriche als Probenmaterial von Patienten im Zuge von Routineuntersuchungen und Behandlungen gesammelt. Die Probanden waren Patienten der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie (Universitätsklinikum Düsseldorf) und die Probenentnahme erfolgte auf den Stationen ME6 und ME10 sowie auf der Zentralen Notaufnahme des UKD.

## 2.1.9 Verwendete Oligonukleotide

**Tabelle 9:** Liste der verwendeten Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5' - 3')	NCBI-Referenz	Position	Amplifikat (bp)
<b>Universelle Primer</b>				
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	AY214446	1..597	597 <sup>b</sup>
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	AY214446	245..597	353 <sup>c</sup>
ITS4.2	TCCTCCGCTTATTGATATG	AY214446	1..597	597 <sup>c</sup>
PanR1	TTTGCTACGCTCTTCATCG	AY944896	404..861	458 <sup>c</sup>
PanR2	TTTGCTACGTTCTTCATCG	EU798702	273..635	363 <sup>c</sup>
PanR3	TTYGCTGCGTTCTTCATCG	AY214446	249..597	349 <sup>c</sup>
PanF4	GAAGAACGCAGCGAAMTG	AY214446	253..597	345 <sup>b</sup>
PanF5	TTCARCAAYGGATCTCTYGG	AY214446	220..597	378 <sup>b</sup>
PanF6	CGATGAAGAACGTAGCAAAGTG	HQ285718	260..630	371 <sup>b</sup>
PanF4b	AAGAACGCAGCGAAMTG	AY214446	254..597	344 <sup>b</sup>
PanF5a	TCAACAACGGATCTCTTGG	AY214446	221..597	377 <sup>b</sup>
PanF5b	TCAGCAATGGATCTCTCGG	JN942680	251..632	382 <sup>b</sup>
PanF6b	GATGAAGAACGTAGCAAAGTG	HQ285718	261..630	370 <sup>b</sup>
<b>Aspergillus- &amp; Penicillium-Primer und Sonden</b>				
AspF	CTGTCCGAGCGTCATTG	JF729022	356..597	242 <sup>b</sup>
AspPenF1	GTCCGAGCGTCATTTCTG	AB353919	351..578	228 <sup>b</sup>
AspPenF2	TCCGAGCGTCATTGCTG	EF634401	328..568	241 <sup>b</sup>
S-Afla <sup>a</sup>	Cy5-GCTTGCCGAACGCAAATCAAT-BHQ2	HQ340107	353..595	243 <sup>d</sup>
S-Afum <sup>a</sup>	6FAM-CAGCCGACACCCAACTTTATTTTTCTA-BHQ1	AY214446	356..597	242 <sup>d</sup>
S-Anig <sup>a</sup>	6FAM-GTCACATGCTCTGTAGGATTGGCC-BHQ1	HQ014696	357..599	243 <sup>d</sup>
S-ter <sup>a</sup>	HEX-CGACGCATTTTGTGCAACTTGTTT-BHQ1	FJ878634	358..608	251 <sup>d</sup>
<b>Mucor-, Rhizomucor-, Rhizopus-Primer</b>				
Muc1b	GAACGCAWCTTGCGCTCA	EU798702	340..635	296 <sup>b</sup>
Muc2b	TTGAACGCAGCTTGCACTC	AY213684	322..627	306 <sup>b</sup>
Muc3	TCATCCATTGGGTACGTCTAG	JQ796883	333..627	295 <sup>b</sup>

**Absidia-, Lichtheimia- & Cunninghamella-Primer**

Abs2	ATYTTTGAACGCATCTTGCA	AY944875	330..647	318 <sup>b</sup>
Lic1	ATFYAGTTGCTGTCATGGCC	EF136359	581..852	272 <sup>b</sup>
Lic2	CATTCAGTTGCTCTCATGGTC	JN561273	587..856	270 <sup>b</sup>

**Fusarium- & Scedosporium-Primer**

Fus1	TCCATWGCCTAGTAGTAAAACCC	FJ478116	413..544	132 <sup>b</sup>
Fus2	TCCATYGCCTAGTAGCTAACACC	JX173101	433..566	134 <sup>b</sup>
Sce1	GTAGGCCCTGAAATACAGTGG	JX949174	373..542	170 <sup>b</sup>

**Cryptococcus-Primer**

Cry1	GAGAGTCATGAAAATCTCAATCCCTC	AJ876525	299..555	257 <sup>b</sup>
Cry2	CTGTTTGAGTGTCATGAAATCTC	AF218974	330..639	253 <sup>b</sup>

**Trichosporon-Primer**

Tri1	CATGAAATCTCAACCACTAGGG	NR_073243	305..539	235 <sup>b</sup>
------	------------------------	-----------	----------	------------------

**Candida-Primer und Sonden**

CanF	CCTGTTTGAGCGTCRTTT	HM016883	306..534	229 <sup>b</sup>
S-Calb <sup>a</sup>	6FAM-CATTGCTTGCGGCGGTARCG-BHQ1	AY939786	307..534	228 <sup>e</sup>
S-Cdub <sup>a</sup>	Cy5-CATTGCTAAGGCGGTCTCTGGC-BHQ2	AJ249484	309..539	231 <sup>e</sup>
S-Cgla <sup>a</sup>	HEX-GGTTTTACCAACTCGGTGTTGATCTAGG-BHQ1	AM492797	573..881	309 <sup>e</sup>
S-Ckru <sup>a</sup>	6FAM-GCTGGCCGAGCGAACTAGACTTT-BHQ1	AB305095	231..469	239 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Sonde mit fluoreszierendem Farbstoff an 5'-Position und Quencher an 3'-Position.

<sup>b</sup> Größe des PCR-Produktes unter Verwendung des Reversprimers ITS4.2.

<sup>c</sup> Größe des PCR-Produktes unter Verwendung des Forwardprimers ITS1.

<sup>d</sup> Größe des PCR-Produktes unter Verwendung der Primer AspF und ITS4.2.

<sup>e</sup> Größe des PCR-Produktes unter Verwendung des Primers CanF und ITS4.2.

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

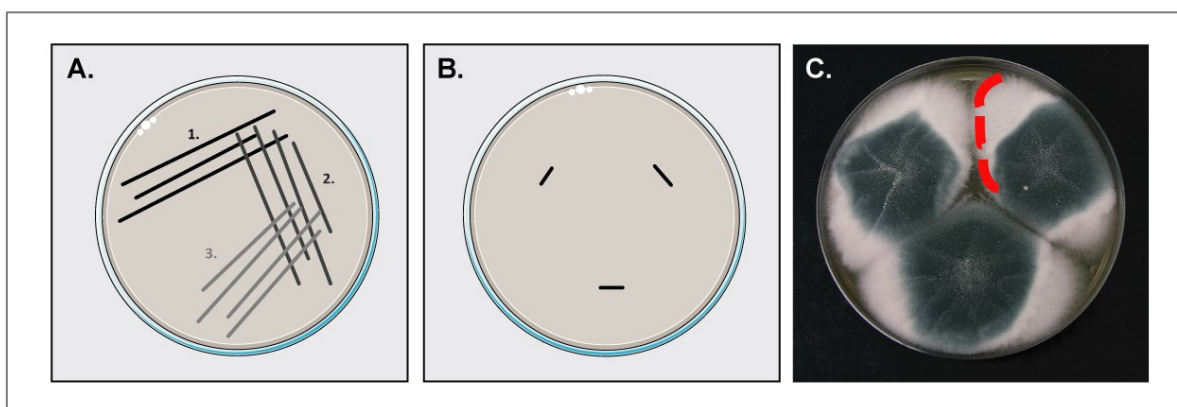
### 2.2.1 Anzucht und Kultivierung von Pilzen

#### 2.2.1.1 Kultivierung auf Agarplatten für eine unmittelbare Verwendung

Zur unmittelbaren Verwendung wurden die Pilzstämmen auf Agarplatten mit einer Größe von 70 mm kultiviert. Die optimalen Nährmedien, welche die besten Wachstumsbedingungen für die jeweiligen Pilzspezies und -familien ermöglichen, sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Alle Kultivierungen wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt.

Bei Arbeiten mit Schimmelpilzen war darauf zu achten, die Arbeitsfläche ausgiebig zu reinigen und die Umluft in der Sicherheitswerkbank ca. 5 Minuten zirkulieren zu lassen, bevor eine neue Kulturplatte geöffnet wurde. Dies war besonders bei Arbeiten mit Pilzen zu berücksichtigen, die einen ausgeprägt büscheligen, spinnwebenartigen Pilzrasen ausbilden (*Rhizopus*, *Rhizomucor* und *Cunninghamella*).

Für eine Weiterkultivierung wurde Pilzmaterial von einer bebrüteten Kulturplatte bzw. aus einer Flüssigkultur mittels einer Plastiköse entnommen. Der Ausstrich von Hefepilzen auf neuen Agarplatten entsprach methodisch dem Ausstrich von Bakterienkulturen (Abbildung 1, A). Eine einzelne Hefepilzkolonie wurde von der ursprünglichen Agarplatte entnommen und mittels eines Dreiösenausstriches auf eine neue Platte ausgestrichen. Hefepilze wurden für mindestens 24 Stunden bei 37 °C unter normaler Atmosphäre kultiviert.



**Abbildung 1:** Kultivierung von Pilzen auf Agarplatten. **A**, Ausstrich von Hefepilzen. **B**, Drei-Punkt-Einstich zur Anzucht von Schimmelpilzen. **C**, Fotografie einer *A. fumigatus*-Kulturplatte. Zu erkennen sind drei Großkolonien. In Rot ist der Wachstumsrand einer Kolonie markiert, an der Probenmaterial für eine weitere Anzucht entnommen werden.

Bei der Neuanzucht von Schimmelpilzen ausgehend von bebrüteten Kulturplatten wurde am Wachstumsrand einer Kolonie vorsichtig Material mittels einer Plastiköse entnommen (Abbildung 1, C). Die Plastiköse wurde an drei Punkten dreiecksförmig in die neue Agarplatte gestochen (Abbildung 1, B). Schimmelpilze wurden für 48 bis 72 Stunden bei 37 °C unter normaler Atmosphäre kultiviert.

Neu angefertigte Kulturplatten wurden mit Parafilm verschlossen, um eine Kontamination zu vermeiden. Sobald die Agarplatten vollständig bewachsen waren, konnten diese für eine Weiterverarbeitung verwendet werden oder für eine maximale Dauer von drei Monaten im Kühlraum bei 2 bis 8 °C gelagert werden.

### **2.2.1.2 Kultivierung in Flüssigkultur zur langfristigen Aufbewahrung von Pilzen**

Für eine langfristige Lagerung von Pilzen wurden Sabouraud-Flüssigkulturen erstellt. Vorab wurden 7 ml Sabouraud-Flüssigmedium in große Reagenzglasröhrchen gefüllt und mittels eines Zellstoffstopfens verschlossen. Die Reagenzglasröhrchen wurden anschließend zur Sterilisierung des Mediums für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Für die Anzucht von Hefepilzen wurden Einzelkolonien mittels einer Plastiköse von Agarplatten entnommen und in das sterile Flüssigmedium überführt. Bei der Anzucht von Schimmelpilzen wurde entsprechend Kapitel 2.2.1.1 verfahren und Material vom Wachstumsrand entnommen. Die so erstellten Flüssigkulturen konnten für eine maximale Dauer von 8 Monaten bei 2 bis 8 °C im Kühlraum gelagert werden. Für eine unmittelbare Verwendung von Pilzen wurden ausgehend von diesen Flüssigkulturen Agarplatten frisch beimpft und kultiviert.

### **2.2.1.3 Ernte von Pilzen**

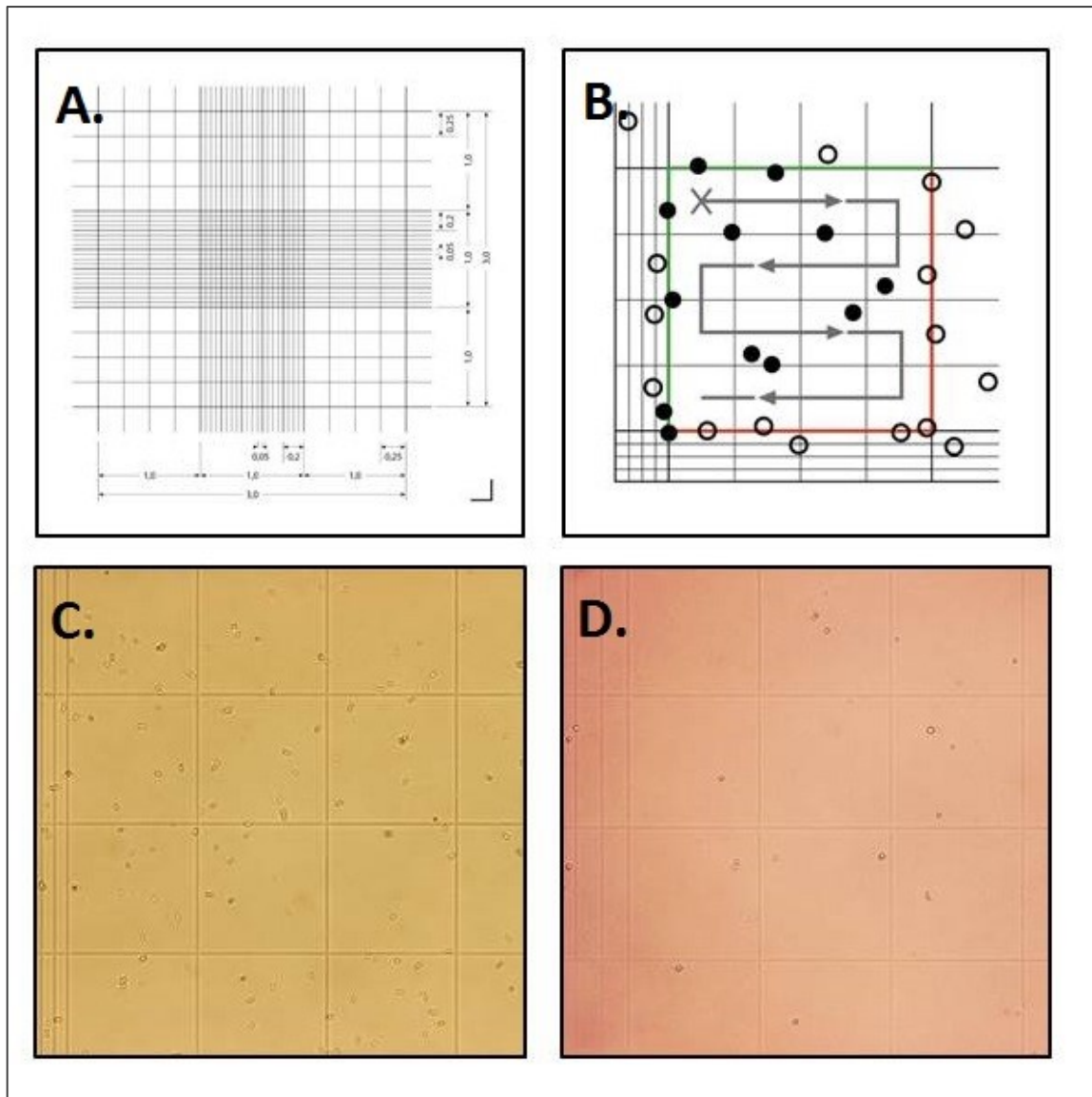
Pilzkulturen (siehe Kapitel 2.2.1.1) wurden in späteren Experimenten zur Isolierung von DNA und Gewinnung von Pilz-Konidien genutzt. Die voll bewachsenen Pilzplatten wurden mit 3 ml 5 % (v/v) Tween20 geflutet. Mit einer Plastiköse wurden Schimmelpilzkolonien vorsichtig von der Agarplatte abgekratzt, ohne die Oberfläche einzustechen. Die Lösung nahm abhängig von der Art des Pilzes eine bräunliche bis schwärzliche Färbung an. Hefepilzkolonien konnten vorsichtig von der Oberfläche abgenommen werden und zu einer milchigen Suspension verrührt werden. Jeweils 200 µl Pilzsuspension wurden entnommen und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß pipettiert. Die Arbeiten wurden stets unter einer Sterilbank durchgeführt.

## 2.2.2 Mikroskopische Auszählung von Pilz-Konidien

Konidien sind ungeschlechtlich gebildete, ein- oder mehrzellige Sporenformen der Pilze. Um standardisierte Bedingungen bei der Durchführung von Experimenten zu gewährleisten und eine definierte Anzahl an Konidien einzusetzen, wurde die Konidienanzahl innerhalb von Pilzsuspensionen mittels Mikroskopie bestimmt. Zum Auszählen der Konidien wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Im Vorfeld wurden Pilzkulturen wie unter Punkt 2.2.1.1 angezogen und entsprechend Kapitel 2.2.1.3 abgeerntet.

Die Zählkammer und Deckgläser wurden vorausgehend in zwei Reinigungsschritten erst mit 95 % Ethanol und anschließend mit Benzin gewaschen. Es sollte darauf geachtet werden, lediglich fusselfreie Tücher zur Reinigung von optischen Bauteilen zu verwenden, um störende Faserrückstände während des Auszählens unter dem Mikroskop zu vermeiden. Nach dem Auflegen der Deckgläser auf die Zählkammer sollten typische Newtonringe zu erkennen sein. An ihnen war zu erkennen, dass die Tiefe der entstandenen Kammer korrekt eingestellt war (0,1 mm).

Sowohl Schimmelpilz- als auch Hefepilzsuspensionen wurden vor dem Auszählen eine Minute lang gevortext, um Zellverbände aufzulösen. Die Suspension wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau gemischt, um die Konidien besser im Mikroskop zu erkennen. Zum Beladen der Zählkammer wurden ca. 15 µl Pilzsuspension eingesetzt. Die Pipettenspitze wurde an den Rand des Deckgläschens angesetzt und 10 µl Pilzsuspension mittels Kapillarkräften zwischen Deckglas und Kammer gesaugt. In Abbildung 2.A ist ein schematischer Aufbau der Neubauer-Zählkammer dargestellt mit den entsprechenden Maßangaben.



**Abbildung 2:** Mikroskopische Auszählung von Pilz-Konidien. **A,** Abbildung einer Neubauer Zählkammer. Die Kammertiefe beträgt 0,1 mm. Die Kammer der Neubauer Improved ist in 3 x 3 Quadrate von je 1,0 mm<sup>2</sup> Fläche unterteilt. Jedes der Eckquadrate ist zusätzlich unterteilt in 4 x 4 weitere Quadrate. **B,** Schematische Darstellung der Auszähltechnik von Konidien. **C,** Mikroskopische Aufnahme von *A. fumigatus*-Konidien. **D,** Mikroskopische Aufnahme von *C. albicans*-Konidien.

Für eine Bestimmung der Konidienanzahl pro ml Pilzsuspension wurden vier Gruppenquadrate ausgezählt. Jedes Gruppenquadrat bestand aus 4 x 4 Einzelquadraten. Das methodische Vorgehen beim Auszählen der Konidien ist in Abbildung 2.B dargestellt. Befanden sich *Aspergillus*- oder *Candida*-Konidien (Abbildung 2, C+D) auf dem Gitterrand eines Einzelquadrates, wurden diese nur für das jeweilige Einzelquadrat gewertet, wenn sie sich auf der oberen und linken Gittermarkierung befanden (grün eingefärbt). Konidien auf dem rechten bzw. unteren Gitterrand (rot eingefärbt) wurden für die Konidienanzahl eines Einzelquadrates nicht gewertet.

Im Zuge der Auszählung wurden alle vier Gruppenquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Bei einer Fläche von 1,0 mm<sup>2</sup> für jedes Gruppenquadrat und einer Kammertiefe von

0,1 mm ergibt sich ein ausgezähltes Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup>. Für die Anzahl an Konidien pro Milliliter wurde der ermittelte Wert hochgerechnet. Die Formel ist nachfolgend aufgeführt.

$$\text{Konidien / ml} = \frac{\text{gezählte Konidien}}{4} \times 10000$$

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Für die DNA-Präparation wurden entweder kultiviertes Pilzmaterial (Kapitel 2.2.1) verwendet oder klinische Proben bestehend aus EDTA-Blut, Blutserum und Rachenabstrichen (Kapitel 2.1.8). Die automatisierte Isolierung von Nukleinsäuren wurde mit der BioRobot EZ1 DSP-Arbeitsstation der Firma Qiagen (Gerätesoftware-Version V1.1004) durchgeführt. Hierzu wurde die EZ1-Flash-Karte mit dem programmierten Protokoll „BioRobot EZ1 DNA Bacteria V1.0 6605 0504“ genutzt.

Klinische Patientenproben wurden entsprechend Kapitel 2.1.8 entnommen und ins Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene geschickt. Für eine DNA-Aufarbeitung mittels BioRobot EZ1 wurden 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 200 µl Probe versetzt. Probenröhrchen mit EDTA-Blut wurden vorher mittels Vortexer durchmischt und anschließend 200 µl EDTA-Blut direkt aus der Probe pipettiert. Probenröhrchen mit Blutserum wurden kurz anzentrifugiert (10 min bei 3.000 x g) und das Probenmaterial direkt aus der sich ausgebildeten Serum-Phase entnommen. Aus dem Probengefäß des Rachenabstriches wurden 500 µl resuspendiertes Material entnommen, 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zell-Sediment in 200 µl G2-Puffer des EZ1-Aufarbeitungskits resuspendiert.

Den 200-µl-Proben (von EDTA-Blut, Blutserum und Rachenabstrich) wurden je 10 µl Proteinase K (600 mAU/ml) zugesetzt und zum Durchmischen gevortext. Die Proben wurden für 30 min bei 56 °C inkubiert und die Proteinase K anschließend für 10 min bei 95 °C inaktiviert. Dann wurden die Proben in 2-ml-Reaktionsgefäße des EZ1 DNA Tissue Kits überführt und der BioRobot EZ1 mit den für die DNA-Aufarbeitung benötigten Reagenzienkartuschen, Pipettenspitzen und Probenröhrchen beladen. Für die Nukleinsäureisolierung wurde das Protokoll „Bacteria 200 µl“ verwendet und das Elutionsvolumen auf 50 µl eingestellt. Die Qualität und Quantität der aufgereinigten DNA wurde gemäß Kapitel 2.3.3.2 mit dem Nanodrop kontrolliert und gemessen.

Für eine DNA-Präparation aus kultivierten Pilzen wurden entsprechende Pilzstämme zuvor entsprechend dem Protokoll von Kapitel 2.2.1.1 angezogen und gemäß Kapitel 2.2.1.3 geerntet. Die Pilzsuspensionen von Schimmelpilzen wurden zur physikalischen Lyse der Zellen zuerst mit flüssigem Stickstoff behandelt. Die 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den Pilzsuspensionen wurden vorsichtig in einen mit flüssigem Stickstoff befüllten Sicherheitsbehälter eingetaucht. Sobald kein Zischen mehr zu hören war und die Proben komplett gefroren waren, wurden die Proben zum Auftauen in einem Heizblock 1 min bei 95 °C erhitzt. Der Prozessablauf des Einfrierens und Auftauens wurde insgesamt drei Mal für jede Schimmelpilzsuspension durchgeführt. 200 µl Suspension wurde mit 10 µl Proteinase K-Lösung (600 mAU/ml) versetzt und die genomische DNA wie eingangs beschrieben aufgereinigt und vermessen (siehe Kapitel 2.3.3.2).

### **2.3.1.1 Mechanische Lyse von Pilzzellen**

In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde EDTA-Blut von gesunden Probanden mit definierten Mengen (100 - 10.000) an Pilzkonidien versetzt (siehe Kapitel 2.2.2). Für die mechanische Lyse der Pilzkonidien wurde der MINILYS-Arbeitsplatz Homogenisator (Peqlab) benutzt. Die MINILYS-Aufschlussgefäße enthielten Keramikkügelchen mit einem Durchmesser von 2,8 mm, 0,5 mm oder 0,1 mm. Die Proben wurden für 25 s bei 6.000 x g mit dem MINILYS-Homogenisator geschüttelt und anschließend 5 s auf Eis gekühlt. Es schloss sich ein weiterer Homogenisierungsschritt für 25 s bei 6.000 x g und Abkühlschritt für 5 s auf Eis an. Die Isolierung der freigesetzten DNA erfolgte wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben.

### **2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein molekularbiologisches Verfahren zur spezifischen Vervielfältigung von Nukleinsäureabschnitten dar [117]. Sie beruht auf der Eigenschaft der DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA als Ausgangsmatrize zu nutzen und nach Primerbindung an den Einzelstrang in 3'-Richtung einen komplementären Gegenstrang zu synthetisieren.

Eine PCR-Vervielfältigung besteht aus einer Abfolge von Zyklen mit definierten Temperaturschritten. Jeder dieser Zyklen besteht aus einem initialen Denaturierungsschritt, in dem die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Während der anschließenden Hybridisierungsphase binden sequenzspezifische Primer an die Einzelstränge und



bilden eine Startsequenz für die DNA-Polymerase. Im finalen Elongationsschritt eines Zyklus erfolgt letztlich die Synthese des neuen DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase, ausgehend von den angelagerten Primern in 3'-Richtung. Nachdem ein PCR-Zyklus abgeschlossen ist, schließt sich ein neuer Zyklus der Reaktionsschritte an, bis letztlich die Vervielfältigung der DNA abgeschlossen ist.

### 2.3.2.1 Konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese

Die Generierung von PCR-Amplifikaten durch eine konventionelle PCR wurde zur Herstellung von Insertsequenzen für die Plasmidklonierung (Kapitel 2.3.5) genutzt. Das Ansetzen des PCR-Mix erfolgte auf Eis. Jeder Mix beinhaltete in seiner Endkonzentration 1 x Reaktionsmix (iQ<sup>tm</sup> Supermix; Bio-Rad Laboratories, USA), bestehend aus Reaktionspuffer, dNTPs, iTaq DNA-Polymerase, MgCl<sub>2</sub> (4 mM Endkonzentration) und Stabilisatoren. Die Forward- und Reversprimer wurden jeweils in einer Endkonzentration von 300 nM eingesetzt. Als Matrize für die PCR wurden 2,5 µl DNA-Lösung pipettiert (5 - 10 ng). Die Zusammensetzung des PCR-Mixes entsprach der in Tabelle 10 aufgelisteten Zusammensetzung, die genauen PCR-Profile sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für eine konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese

Bestandteil	Volumen	Endkonzentration
DNA-Template (5 - 10 ng)	2,0 µl	-
2 x Reaktionsmix	12,5 µl	1 x
Primer 1 (Forward) (100 µM)	0,25 µl	300 nM
Primer 2 (Revers) (100 µM)	0,25 µl	300 nM
H <sub>2</sub> O	10,0 µl	-

**Tabelle 11:** Auflistung des PCR-Laufprotokolls für eine konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese

Funktion	Dauer	Temperatur	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	10 min	50 °C	
DNA-Denaturierung	10 min	95 °C	
DNA-Denaturierung	15 s	95 °C	} 40 x
Hybridisierung + Elongation	1 min	60 °C	
Pause	unendlich	4 °C	

Die verwendeten Forward- und Reversprimer wurden entsprechend der zu amplifizierenden Sequenzen ausgewählt und sind in Tabelle 9 aufgeführt.

### 2.3.2.2 Realtime-PCR mit DNA-Farbstoffen, Schmelzkurvenanalyse und TaqMan-Sonden

Die Realtime-PCR basiert auf den herkömmlichen Prinzipien der konventionellen PCR, wobei zusätzlich ein fluoreszierender Farbstoff in den Reaktionen eingesetzt wird. Während des Elongationsschrittes interkaliert der verwendete Farbstoff in das doppelsträngige DNA-Molekül, wodurch die Fluoreszenz dieses Farbstoffes ansteigt. Während der Amplifikation nimmt die gemessene Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgt in Echtzeit gegen Ende der Elongation während eines jeden PCR-Zyklus.

In der fuPCR wurde der asymmetrische Cyanin-Farbstoff SYBR Green verwendet [118], welcher unspezifisch doppelsträngige DNA bindet. In die ausgebildeten DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexe wird Lichtenergie mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 494$  nm eingestrahlt, wobei grünes Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 521$  nm emittiert und gemessen wird.

Die verschiedenen Realtime-PCRs der fuPCR wurden je in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l angesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Mixes ist in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12:** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für eine Realtime-PCR mit DNA-Farbstoffen und Schmelzkurvenanalyse

Bestandteil	Volumen	Endkonzentration
DNA-Template (1 - 10 ng)	2,5 $\mu$ l	-
2 x Reaktionsmix	12,5 $\mu$ l	1 x
Primer 1 (Forward) (100 $\mu$ M)	0,25 $\mu$ l	300 nM
Primer 2 (Revers) (100 $\mu$ M)	0,25 $\mu$ l	300 nM
H <sub>2</sub> O	9,5 $\mu$ l	-

Jeder Mix beinhaltet in seiner Endkonzentration 1 x Reaktionsmix (MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay NO Rox; RT-SY2X-06+WOU; Eurogentec, Belgien), bestehend aus Reaktionspuffer, dNTPs (inklusive dUTPs), Meteor Taq DNA Polymerase, MgCl<sub>2</sub> (4 mM Endkonzentration), SYBR Green I und Stabilisatoren. Die Forward- und Reversprimer wurden jeweils in einer Endkonzentration von 300 nM eingesetzt. Bei Duplexreaktionen mit zwei

Forwardprimern betrug die Konzentration eines jeden Primers 150 nM. Wurde eine PCR als Multiplex-Reaktion mit drei Forwardprimern angesetzt, betrug die Primerkonzentration jeweils 100 nM. Als Matrize für die PCR wurden 2,5 µl DNA-Lösung pipettiert (5 - 10 ng). Die genauen Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die verwendeten Primer wurden von der Firma metabion international AG (Steinkirchen, Deutschland) bestellt und sind in Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 13:** Auflistung des PCR-Laufprotokolls für eine Realtime-PCR mit SYBR Green DNA-Farbstoff und Schmelzkurvenanalyse

Funktion	Dauer	Temperatur	Zyklen / Schmelzkurve
Aktivierung der Polymerase	10 min	50 °C	
DNA-Denaturierung	10 min	95 °C	
DNA-Denaturierung	15 s	95 °C	40 x
Hybridisierung + Elongation	1 min	60 °C	
Finalisierung	15 s	95 °C	
	1 min	60 °C	
Starttemperatur	-	65 °C	[Schmelzkurven-analyse]
Endtemperatur	-	95 °C	
Inkrement	15 s	+ 0,5 °C	
Pause	unendlich	4 °C	

Die PCR-Daten wurden mit der Bio-Rad CFX Manager Software (Version 2.1; Bio-Rad Laboratories) ausgewertet. Im Zuge einer Schmelzkurvenanalyse werden amplifizierte DNA-Doppelstränge zyklisch aufgeschmolzen (95 °C) und auf eine Temperatur von 65 °C + (0,5 °C/Zyklus) abgekühlt, was so lange wieder zur Generierung eines Doppelstrangs führt, bis die Schmelztemperatur des PCR-Produktes erreicht wird. Das im ausgebildeten DNA-Doppelstrang zur Fluoreszenz befähigte SYBR Green verliert seine starke Fluoreszenz, wenn die DNA aufgeschmolzen ist und es frei in Lösung vorliegt. Ist der Schmelzpunkt des PCR-Produktes erreicht, so kommt es zu einem starken Abfall der Fluoreszenz. Die Änderungen der relativen Fluoreszenzsignale über die Zeit werden durch den PCR-Cycler aufgezeichnet und grafisch dargestellt als Absolutwert der ersten Ableitung des Fluoreszenzsignals (y-Achse) gegen die Temperatur in °C (x-Achse). Die Auswertung der Schmelzkurvenanalyse wird in Kapitel 3.4.1 beschrieben.

Die TaqMan-PCR, d. h. die Realtime-PCR mit TaqMan-Sonden, basiert auf den Prinzipien einer konventionellen PCR. Das Fluoreszenzsignal wird jedoch im Gegensatz zu unspezifisch interkalisierenden Farbstoffen durch eine sequenzspezifische DNA-Sonde visualisiert, die an die von den Primern flankierte Genregion bindet. Die Sonden bestehen aus Oligonukleotiden, die endständig fluoreszierende Farbstoffe (5'-Ende) und Quencher (3'-Ende) enthalten. Wenn die Sonde während der PCR an ihre komplementäre DNA-Sequenz bindet, werden Farbstoff und

Quencher durch die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase im Zuge der Elongation abgespalten. Nicht länger durch die räumliche Nähe des Quenchers inhibiert, kann das Fluorophor nun angeregt und die folgende Fluoreszenz gemessen werden.

Die TaqMan-PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Mixes ist in Tabelle 14 aufgelistet.

**Tabelle 14:** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes mit TaqMan-Sonden

Bestandteil	Volumen	Endkonzentration
DNA-Template (1 - 10 ng)	2,5 µl	-
2 x Reaktionsmix	12,5 µl	1 x
Primer 1 (Forward) (100 µM)	0,25 µl	300 nM
Primer 2 (Revers) (100 µM)	0,25 µl	300 nM
Sonde 1 (100 µM)	0,25 µl	150 nM
Sonde 2 (100 µM)	0,25 µl	150 nM
H <sub>2</sub> O	9,0 µl	-

Jeder Mix beinhaltet in seiner Endkonzentration 1 x Reaktionsmix (Takyon No ROX Probe MasterMix UNG; UF-NPMU-C0101; Eurogentec, Belgien), bestehend aus Reaktionspuffer, dNTPs (inklusive dUTPs), Takyon DNA-Polymerase, MgCl<sub>2</sub> (4 mM Endkonzentration), Uracil-N-Glycosylase und Stabilisatoren. Als Matrize für die PCR wurden 2,5 µl DNA-Lösung pipettiert (5 - 10 ng). Die Forward- und Reversprimer wurden jeweils in einer Konzentration von 300 nM eingesetzt. Pro PCR-Ansatz wurden immer zwei verschiedene Sonden mit unterschiedlichen Farbstoff- und Quencher-Kombinationen in einer Konzentration von 150 nM verwendet. Die Kombination der verwendeten Primer und Sonden sowie die angeregten Farbkanäle sind in Tabelle 15 aufgelistet.

**Tabelle 15:** Primer- und Sonden-Kombinationen der TaqMan-Mixe sowie angeregte Farbkanäle

Primer	Sonden	Pilz-Spezies	Farbkanal	ABS [nm]	EM [nm]
<b><i>Aspergillus</i>-spezifischer Mix</b>					
AspF + ITS4.2	S-Anig	<i>A. niger</i>	FAM	494	520
	S-Ater	<i>A. terreus</i>	HEX	535	556
AspF + ITS4.2	S-Afla	<i>A. flavus</i>	Cy5	649	670
	S-Afum	<i>A. fumigatus</i>	FAM	494	520
<b><i>Candida</i>-spezifischer Mix</b>					
CanF + ITS4.2	S-Calb	<i>C. albicans</i>	FAM	494	520
	S-Cdub	<i>C. dubliniensis</i>	Cy5	649	670
CanF + ITS4.2	S-Cgla	<i>C. glabrata</i>	HEX	535	556
	S-Ckru	<i>C. krusei</i>	FAM	494	520

Alle verwendeten TaqMan-Sonden wurden von der Firma biomers.net (Ulm, Deutschland) bestellt. Die genauen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tabelle 16:** Auflistung des PCR-Laufprotokolls mit TaqMan-Sonden

<b>Funktion</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zyklen</b>
Aktivierung der Polymerase	10 min	50 °C	
DNA-Denaturierung	10 min	95 °C	
DNA-Denaturierung	15 s	95 °C	} 40 x
Hybridisierung + Elongation	1 min	60 °C	
Finalisierung	15 s	95 °C	
	1 min	60 °C	
Pause	unendlich	4 °C	

### 2.3.3 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

#### 2.3.3.1 Direkte Aufreinigung von Amplifikaten aus PCR-Reaktionen

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte durch Verwendung des Kits „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ der Firma Machery & Nagel. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf einer Bindung der DNA an eine Silica-Membran, der Entfernung von unerwünschten Reaktionsbestandteilen durch Waschstreps mit Pufferlösungen und Elution der DNA von der Membran.

Die erforderlichen Schritte zur Aufreinigung wurden nach Angaben des Herstellerprotokolls gemäß Kit-Handbuch („PCR clean-up Gel extraction User manual“, Rev. 04), Protokoll 5.1 durchgeführt. Das finale Elutionsvolumen wurde auf 30 µL eingestellt.

### **2.3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration und Reinheit von PCR-Produkt- und genomischer DNA-Lösungen wurde mittels Nanodrop (Thermo Scientific) ermittelt. Grundprinzip ist die Spektralphotometrie, basierend auf Absorptionsmessungen von ultraviolettem Licht im Wellenlängen-Bereich von 260 nm. Die Reinheit der DNA resultiert aus den Quotienten der Absorption bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein). Als Negativkontrolle für aufgereinigte PCR-Proben (gemäß Kapitel 2.3.3.1) wurde der Puffer NE aus dem Aufreinigungs-Kit verwendet. Für genomische DNA-Lösungen (siehe Kapitel 2.3.1) wurde PBS als Nullwert verwendet.

### **2.3.4 Sequenzierung**

Zur Bestimmung der von den Primern flankierten Sequenz der PCR-Produkte wurden diese nach Aufreinigung im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und von der Firma Beckman Coulter Genomics (Danvers, USA) sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger [119]. Die erhaltenen Chromatographiedaten der Sequenzen wurden mithilfe des Softwareprogramms Genious ausgewertet.

### **2.3.5 Klonierung von PCR-Amplifikations-Kontrollen**

#### **2.3.5.1 Ligation von PCR-Produkten in pGemT**

Der linearisierte pGemT-Vektor besitzt an seinem 3'-Terminus einen einzelnen Thymidin-Überhang, der die Ligationseffizienz von PCR-Produkten in den Vektor erhöht und zugleich eine Rezirkulation des Plasmids verhindert, da konventionelle Taq-Polymerasen während der Strangsynthese unspezifisch ein zusätzliches Nukleotid (dATP) am 3'-Ende anfügen (3'-Adenin-Überhang). Die Ligation wurde unter Verwendung des Rapid DNA Ligation Kits (Roche) durchgeführt. Dabei wurden Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 in einem Volumen von 4 µl gemischt. Der Ligationsansatz wurde nach Herstellerangaben angefertigt (0,5 µl T4 DNA Ligase (5 U/ µl), 1 µl 5 x DNA Dilution Buffer und 5 µl 2 x T4 DNA Ligation Buffer). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, in dem dH<sub>2</sub>O statt Insert-DNA pipettiert wurde. Der komplette Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.3.5.2 Transformation von *E. coli*-Bakterien

Für die Transformation wurde der Bakterienstamm DH5 $\alpha$  (Kapitel 2.1.7.2) verwendet und 100  $\mu$ l kompetente Bakterien (Transformationsrate zwischen  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Bakterien/ $\mu$ g pT7T3) auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde der in Kapitel 2.3.5.1 beschriebene Ligationsansatz zu den Bakterien pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 90 s auf 42 °C erhitzt und 2 min auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wurden 400  $\mu$ l im Wasserbad erwärmtes LB Medium ohne Antibiotikum zugesetzt und dieses Gemisch anschließend in ein steriles Reagenzglas überführt. Die Proben wurden für 90 min bei 37 °C im Schüttler unter 750 UpM inkubiert.

Für die Blau-weiß-Selektion wurden LB-Amp-Agarplatten (50  $\mu$ g/ml Ampicillin) vorbereitet. Auf die Platten wurden 100  $\mu$ l LB-Medium, 10  $\mu$ l IPTG (1M) und 100  $\mu$ l X-Gal (20 mg/ml) pipettiert. Nach dem Trocknen wurde der Ligationsansatz auf zwei Agarplatten ausplattiert (1/10 Volumen und 9/10 Volumen) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.5.3 Plasmidpräparation aus Bakterien

Für die Plasmidpräparation wurde eine einzelne *E. coli*-Bakterienkolonie (siehe Kapitel 2.3.5.2) gepickt und in 5 ml LB-Amp-Medium in sterilen Kulturröhrchen über Nacht bei 37 °C und 200 UpM inkubiert. Die Plasmidisolation der Übernachtskultur erfolgte mittels Plasmid-Aufreinigungskit von Roche (High Pure Plasmid Isolation Kit) gemäß dem Herstellerprotokoll (High Pure Plasmid Isolation Kit User Manual, Version 8.0). Die DNA-Konzentration der 50  $\mu$ l Plasmidlösung wurde mittels Nanodrop ermittelt. Die Plasmide wurden mit den vektorspezifischen Primern „pUC/M13 Forward Sequencing Primer“ und „pUC/M13 Revers Sequencing Primer“ sequenziert, um zu verifizieren, dass die Inserts korrekt in das Plasmid inseriert wurden. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.3.5.4 Herstellung von Bakterien-Glycerinstocks

Für eine langfristige Einlagerung der transformierten Bakterienstämme wurden Bakterien-Glycerinstocks erstellt. 500  $\mu$ l Bakterienkultur (meist Übernachtskulturen) wurden mit 500  $\mu$ l sterilem Glycerin (98 %) gemischt und nach 20 min Inkubation bei RT bei -80 °C gelagert.

## 2.4 Computerbasierte Methoden

### 2.4.1 Erfassung der Sequenzdaten

Für die Generierung von multiplen Sequenzalignments (siehe Kapitel 2.4.3) und letztlich die Primergenerierung mussten im Vorfeld Sequenzdaten aus webbasierten Datenbanken gesammelt werden. Für die Suche und Extraktion der Sequenzen wurden die im Folgenden aufgeführten Datenbanken verwendet.

- **GenBank.** National Center for Biotechnology Information.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- **EMBL.** European Bioinformatics Institute.  
<http://www.ebi.ac.uk/embl/>
- **FungiDB.**  
<http://fungidb.org/fungidb/>
- **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.**  
<http://www.cbs.knaw.nl/>

Innerhalb der Datenbanken wurde eine Suche nach den ITS1, 5.8S und ITS2 (siehe Kapitel 3.2) umfassenden Genabschnitten der jeweils gewünschten Pilzspezies durchgeführt. Die Sequenzdaten der ribosomalen DNA wurden im \*.gb- (GeneBank) und \*.fas- (FASTA) Datei-Format gespeichert. Die extrahierten Sequenzen wurden einem Homologievergleich mittels BLAST-Analyse unterzogen (siehe Kapitel 2.4.2), um fehlerhaft annotierte Pilzsequenzen zu identifizieren und ausschließen zu können. Die Anzahl und Zusammensetzung der extrahierten Sequenzdaten ist in Tabelle 17 des Ergebnisteils dargestellt. Alle 1521 gesammelten Sequenzen mit dazugehörigen ACC-Nummern sind im Anhang (Kapitel 8) der Dissertation aufgelistet und können über die Datenbanken abgerufen werden.



## 2.4.2 Homologievergleiche mittels BLAST-Analyse

Eines der wichtigsten Werkzeuge zur Suche homologer DNA-Sequenzen bildet der BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) [120]. Das Grundprinzip des BLAST-Algorithmus ist die Suche nach kurzen, lokalen, paarweisen Alignments definierter Länge und ohne Lücken (Gaps). Die gebildeten Teilsequenzen werden erweitert unter Berücksichtigung von Scoring-Werten. Nach der Identifizierung von gehäuften Teilsequenzen in einem Bereich und der Berechnung der Wahrscheinlichkeit, diese Teilsequenzen per Zufall in den Datenbanksequenzen zu finden, erfolgt die Auflistung der Suchanfrage.

Die BLAST-Software ist auf den Servern des NCBI/EBI implementiert und kann dort frei über das webbasierte Tool genutzt werden (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Für die Homologie-Vergleiche von sequenzierten PCR-Produkten wurde das BLAST-Programm „nucleotide blast“ verwendet. Folgende Parameter-Anpassungen wurden abweichend von den Standard-einstellungen in der Webmaske vorgenommen:

<b>BLAST algorithm</b>	Blastn - megablast
<b>Database</b>	Nucleotide collection (nr/nt)
<b>Exclude</b>	Uncultured / environmental sample sequences

Der Ident-Wert (Identitätswert) gibt Auskunft über den Grad an Übereinstimmungen, den zwei Sequenzen an den gleichen Positionen innerhalb ihrer Abfolge haben. Er wird als prozentualer Wert ausgedrückt und eine prozentuale Übereinstimmung von 98 bis 100 % wurde im Zuge der Analysen als ein übereinstimmendes Suchergebnis gewertet.

Die Homologievergleiche mittels BLAST wurden im Zuge der Dissertation genutzt, um die amplifizierten PCR-Fragmente bei der Analyse von Patientenproben zu überprüfen (Kapitel 3.6), um die erfolgreiche Transformation von PCR-Fragmenten in Plasmide (Kapitel 2.3.5) sicherzustellen und um im Prozess des Primer-Designs die korrekte Vervielfältigung der Referenzstämme zu bestätigen (Kapitel 3.4 und 3.5).

### 2.4.3 Das Geneious-Softwarepaket

Das Geneious-Softwarepaket wurde in der Version „Geneious Pro 5.5.8“ verwendet. Die gesammelten Sequenzdaten (Kapitel 3.2) wurden dazu genutzt, multiple Sequenzalignments und phylogenetische Bäume als Basis für weitere Arbeitsschritte der Dissertation zu generieren. Die einzelnen Verarbeitungsmethoden waren in Form von Modulen in das Geneious-Softwarepaket integriert.

#### Multiple Sequenzalignments

Für die Generierung von multiplen Sequenzalignments wurde der ClustalW-Algorithmus genutzt [121]. Alle Alignments wurden mit der Option „free end gaps“ erstellt. Folgende Einstellungen wurden verwendet:

<b>Kostenmatrize</b>	CLUSTALW
<b>Gap open cost</b>	8
<b>Gap extend cost</b>	3

#### Geneious Tree Builder

Die multiplen Sequenzalignments wurden dazu genutzt, phylogenetische Stammbäume mittels Geneious Tree Builder zu erstellen. Die folgenden Einstellungen wurden hierzu verwendet:

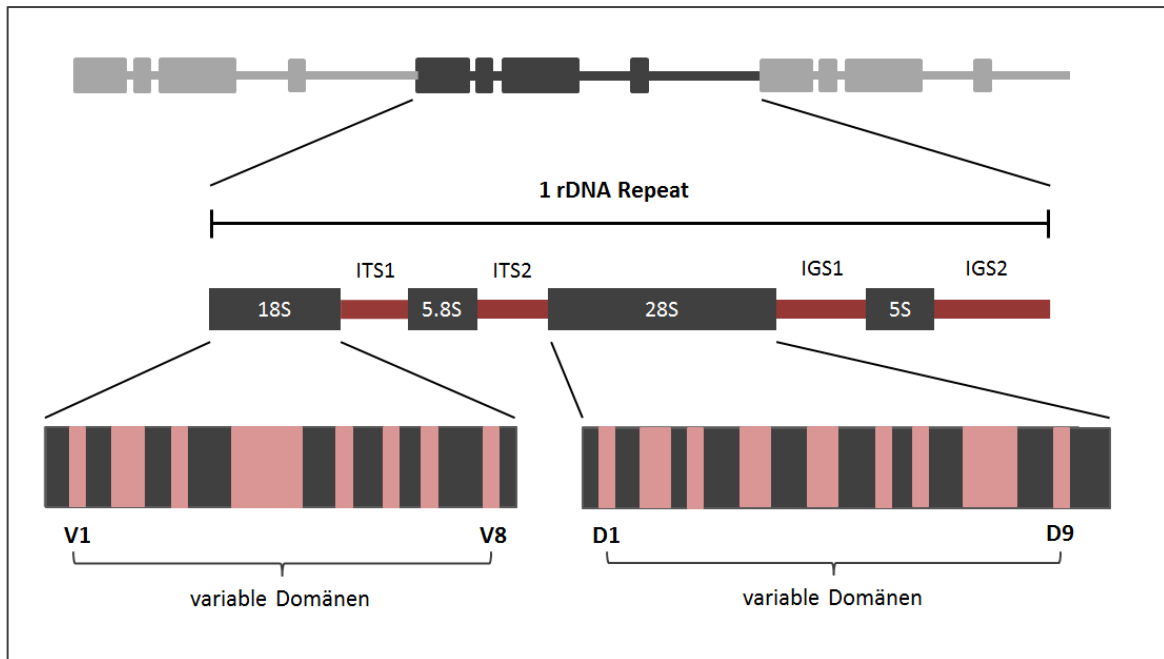
<b>Genetic Distance Model</b>	Jukes-Cantor
<b>Tree building Method</b>	Neighbor-Joining
<b>Outgroup</b>	No Outgroup

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Die ribosomale DNA als geeignete Zielregion der fuPCR

Bislang wurden verschiedene Gene als PCR-Targets genutzt, u. a. Gene für  $\beta$ -Tubulin II (*TUB2*) [122, 123],  $\gamma$ -Aktin (*ACT*) [124], Translation-Elongation-Faktor 1- $\alpha$  (*TEF1 $\alpha$* ) [124] oder Untereinheiten der RNA-Polymerase II (*RPB2*) [124].

Zu den populärsten und am häufigsten genutzten Zielregionen gehören jedoch die Gene des ribosomalen RNA- (rRNA-)Genclusters; auch rDNA-Cluster genannt, da sie im Vergleich zu anderen Target-Genen einen Vorteil für den breiten molekularbiologischen Nachweis von Pilzen vereinen: ihre hohe Kopienzahl pro Genom. Das eukaryotische rDNA-Cluster besteht aus den 18S, 5.8S und 28S rRNA-Genen, die von „internal transcribed spacer“ (ITS)-Elementen getrennt werden. Die ITS-Elemente sind Nukleotidsequenzen, die zwischen den jeweiligen rRNA-Genen liegen und eine höhere Variabilität aufweisen als die rRNA-Gene (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Schematische Übersicht des ribosomalen RNA-Genclusters bei Eukaryonten. Dargestellt sind die Gene der ribosomalen Untereinheiten (5S, 18S, 5.8S, 28S und 5S) sowie die verbindenden internal transcribed spacer (ITS) und intergenic spacer (IGS)-Sequenzelemente. Sequenzvariabilitäten sind farblich hervorgehoben: hoch konserviert (schwarz), leichte Variabilität (rosa) und hohe Variabilität (rot). (Abbildung abgeändert nach R. Vilgalys: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>).

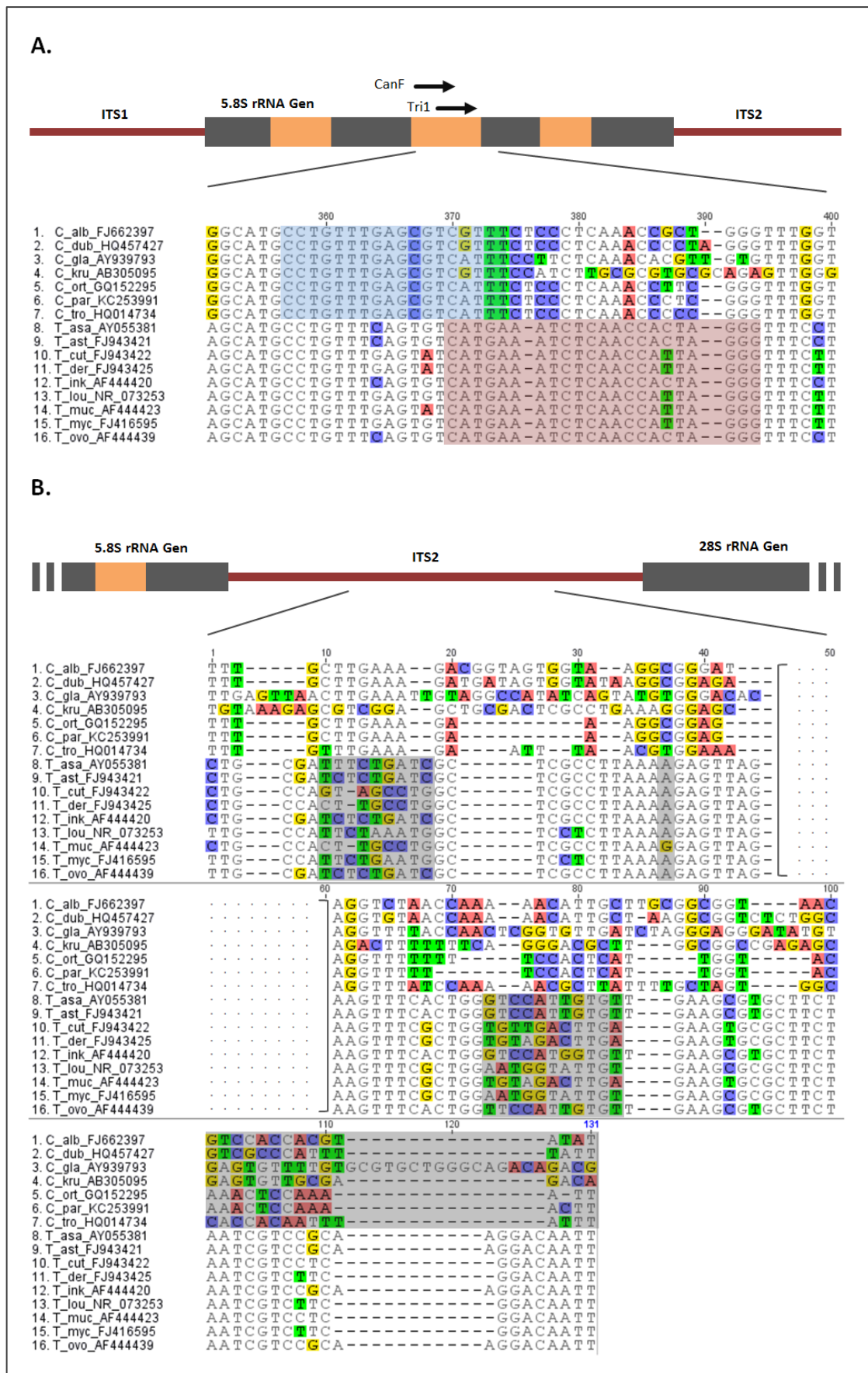
Die nacheinander folgenden 18S-, 5.8S- und 28S-rRNA-Gene bilden eine Transkriptionseinheit und befinden sich vor dem 5S-rRNA-Gen (5S rDNA), welches wiederum ebenfalls eine eigenständige Transkriptionseinheit darstellt. Beide Transkriptionseinheiten werden durch „intergenic spacer“ (IGS)-Nukleotidsequenzen getrennt und stellen zusammen eine Wiederholungseinheit (rDNA-Repeat) dar [125, 126]. Die rDNA-Repeats liegen hintereinander aufgereiht in hoher Kopienzahl vor [127, 128]. So trägt die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* bis zu 200 Kopien der rDNA in ihrem Genom [129]. Die Kopienzahl kann jedoch zwischen Organismen stark schwanken und selbst innerhalb einer Spezies ist die Kopienzahl abhängig vom jeweiligen Isolat einer Pilzspezies. So konnten in *Aspergillus fumigatus*-Variationen zwischen 38 und 91 Kopien pro Genom festgestellt werden [130]. Trotz dieser Schwankungen ist der Vorteil von Zielregionen mit multiplen Kopien bedeutend, da ihre erhöhte Anzahl an Targets pro Zelle die Sensitivität einer PCR deutlich steigert im Vergleich zu Zielregionen, die nur in geringen oder einfachen Kopienzahlen („single copy“) vorliegen [131].

Neben der Anordnung der rRNA-Gene war die charakteristische, tandemartige Abfolge von hoch konservierten und hochvariablen Sequenzabschnitten ein entscheidender Vorteil des ribosomalen Genclusters für die Konzeption der fuPCR. Die rRNA-Gene sind die bedeutendsten strukturellen und katalytischen Komponenten der Ribosomen [132]. Sie gehören zu den häufigsten und wichtigsten Haushaltsgenen der Zelle [133]. Innerhalb der rRNA-Gene existieren daher Segmente, die in nahezu allen bekannten Organismen hoch konserviert vorliegen [134]. Diese Bereiche sind

von großer Bedeutung für die ribosomale katalytische Aktivität und verbleiben daher aufgrund des hohen Selektionsdrucks auf genetischem Level in ihrer Sequenzabfolge unverändert (siehe Abbildung 3) [135, 136]. Diese konservierten Segmente können als Bindungsregionen für entsprechende PCR-Primer genutzt werden und ermöglichen im Idealfall die Detektion aller Pilze. Neben Bereichen der rRNA-Gene, die hoch konserviert sind, gibt es zudem variable Sequenzabschnitte (D- und V-Domänen) innerhalb des rRNA-Clusters (siehe Abbildung 3) [134]. Diese variablen Domänen unterscheiden sich auf genetischer Ebene zwischen Organismen stark. PCR-Produkte, deren Primer in (Familien- oder Phylum-)konservierten Regionen binden, jedoch eine variable Domäne umschließen, können nach einer (Sanger-)Sequenzierung oft für eine Spezies-Identifikation genutzt werden. So konnten wir erfolgreich unter Verwendung von bereits publizierten universellen Primern größere Bereiche des rDNA-Genclusters von zwei unbenannten Pilzen amplifizieren und nach Sangersequenzierung den Gattungen *Gongronella* und *Fusarium* [137] zuordnen. Aufgrund der universellen Natur der verwendeten Primer beschränkte sich die Bestimmung der Pilze zu diesem Zeitpunkt auf ihre Gattung und erlaubte noch keine anschließende Identifizierung der Pilz-Spezies.

Die weiterführende Grundidee für die zu entwickelnde fuPCR war es, 13 Pilzgenera, die bei hämatologischen Patienten zu invasiven Mykosen führen können, durch ein Set von sieben PCR-Reaktionen nachweisen zu können, um somit einen Pilz innerhalb eines einzigen PCR-Laufes zu identifizieren. Durch variable, konservierte und hoch konservierte Regionen des rDNA-Clusters sollte ein Set an Forwardprimern entwickelt werden, um die phylogenetischen Zweige und Genera der Pilze aufzufächern. Eine achte Reaktion sollte dabei als Backup- und universelle Pan-Fungal-Reaktion dienen (siehe Kapitel 3.5). Die PCR sollte dabei als SYBR Green Assay mit anschließender Schmelzkurvenanalyse realisiert werden, um die spezifischen PCR-Produkte einfach und schnell zu identifizieren. Die PCR-Produkte positiver Zweig-PCRs sollten dann sequenziert werden, um die Identifizierung der Pilzspezies zu ermöglichen. Neben den zweigspezifischen Forwardprimern sollte ein universeller Reversprimer entwickelt werden, der die Sequenzierung der PCR-Produkte aller Zweig-PCRs ermöglicht.

Um die Validität einer Amplifikationsregion zum Nachweis eines phylogenetischen Pilzzweiges (Pilzfamilie oder -gattung) beurteilen zu können, war die Verfügbarkeit von möglichst vielen Sequenzen des entsprechenden PCR-Targets in Datenbanken (siehe Kapitel 3.2) essentiell. Die Sequenzdaten wurden für die Erstellung von multiplen Sequenzalignments benötigt, welche die Ausgangsbasis für die Generierung von Zweig- und genuspezifischen Primern darstellten. Je höher die Anzahl der Sequenzen verschiedener Pilzisolat innerhalb der zu detektierenden Familie oder des Genus ausfiel, desto besser war zu beurteilen, ob ein Primer in seiner Bindung die erforderliche Spezifität und Sensitivität für diese Gruppe besitzt. Variationen innerhalb eines phylogenetischen Zweigs (= definierte Pilzgruppe) wurden im Alignment deutlich und ermöglichten dann die erforderliche Anpassung der fuPCR-Primer (siehe Abbildung 4.A).



**Abbildung 4: Multiple Sequenzalignments von sieben *Candida*- und neun *Trichosporon*-Spezies. A, Binderegionen der *Candida*- (blaue Box) und *Trichosporon*- (rote Box) spezifischen Forwardprimer an die 5.8S rDNA. B, Sequenzalignment der ITS2-Region. Speziesspezifische Regionen sind grau hinterlegt.**

Exemplarisch ließ sich so zeigen, dass der Primer CanF (blaue Schattierung) in seiner Bindung spezifisch für Pilze der *Candida*-Spezies (Sequenzen 1 bis 7) ist. Seine Bindungsregion unterscheidet sich in seiner DNA-Sequenz von Pilzen der *Trichosporon*-Spezies (Sequenzen 8 bis 16) und trennt damit diese Gruppen voneinander. Dahingegen ist der Forwardprimer Tri1 (rote Schattierung) in seiner DNA-Sequenz und Bindungsregion spezifisch für *Trichosporon*-Spezies, die keine Bindung des CanF-Primers erlauben. An der Basen-Position 371 wurde zudem eine Nukleotid-Variation innerhalb der *Candida*-Gruppe sichtbar, welche sich in der Substitution einer Guanin-Nukleinbase (*C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. krusei*) zu einer Adenin-Nukleinbase (*C. glabrata*, *C. ortopsilosis*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis*) zeigte. Eine ähnliche Nukleotid-Variation zeigte sich in der Binderegion des Tri1-Primers und offenbarte die Substitution einer Cytosin- (*T. asahii*, *T. asteroides*, *T. inkin* und *T. ovoides*) zu einer Thymidin-Nukleinbase (*T. cutaneum*, *T. dermatis*, *T. loubieri*, *T. mucoides* und *T. mycotoxinivorans*). Ausgehend von dieser Nukleotid-Variation wurde der Tri1-Primer angepasst und bei der Synthese des Oligonukleotids wurde an dieser Basenposition eine degenerierte Base ( $R = A + G$ ;  $Y = C + T$ ) verwendet [138].

Neben den konservierten Regionen, die trotzdem Variationen innerhalb einer Gruppe verdeutlichten und die Bindung der familien- und gruppenspezifischen Primer ermöglichten, mussten darüber hinaus variable Regionen in der PCR von den Primern flankiert sein, die die Differenzierung einer Spezies ermöglichten. Diese variablen Regionen sollten bezüglich ihrer DNA-Sequenz dann spezifisch für die jeweilige Spezies einer Pilzfamilie sein. Die amplifizierten DNA-Abschnitte der fuPCR sollten nach Sequenzierung in einem Datenbankabgleich (siehe Kapitel 2.4.2) die Pilzspezies möglichst spezifisch identifizieren. Die ITS2-Region des ribosomalen Genclusters ermöglichte aufgrund ihrer hohen Sequenzvariabilität diese eindeutige Differenzierung von Pilzspezies (siehe Abbildung 4.B). Die amplifizierten Regionen durch die CanF + ITS4.2- sowie Tri1 + ITS4.2-Primer lieferten PCR-Produkte, die sich innerhalb ihrer Familie unterschieden und eine Identifikation von *Candida*- (Sequenzen 1 bis 7) und *Trichosporon*-Spezies (Sequenzen 8 bis 16) ermöglichten. Um eine optimale Hybridisierungstemperatur bei 60 °C gewährleisten zu können, wurde der universelle Reversprimer ITS4 um ein dCMP am 3'-Ende verkürzt (ITS4.2).

Die verfügbaren Sequenzdaten der 18S- und 28S-rDNA deckten zum Zeitpunkt der Datenbankenanalysen nicht alle Pilzfamilien und -spezies ab, die im gewünschten Detektions-Spektrum der fuPCR enthalten sein sollten. Die Sequenzen der am häufigsten publizierten Pilze wie *Aspergillus* spp. und *Candida* spp. waren zwar vorhanden, jedoch waren die Sequenzen von seltenen humanpathogenen Pilzen wie beispielsweise der Ordnung der *Mucorales* oder der Gattung *Fusarium* unvollständig. Die Generierung von gruppenspezifischen Primern war daher für diese Pilze nicht möglich. Aus diesem Grund wurde sowohl die 18S- als auch die 28S-rDNA als potentielle fuPCR-Targets verworfen.

Im Gegensatz zur 18S- und 28S-rDNA umfassten die Datenbanken viele Sequenzen der 5.8S-rDNA inklusive der flankierenden ITS1- und ITS2-Regionen und zwar von allen gewünschten Pilzfamilien, was für die fuPCR ein zwingendes Kriterium darstellte. Die 5.8S-rDNA sowie die flankierenden ITS-Sequenzabschnitte eigneten sich neben der Identifikation des Pilz-Genus aufgrund ihrer variablen Bereiche auch für eine genaue Differenzierung der Pilzspezies. Mithilfe von *Aspergillus*- und *Candida*-spezifischen Primern, die in der 5.8S-ITS2-Region binden, konnten wir in einem anderen Projekt in oralen Proben erfolgreich *Candida*-DNA nachweisen und mittels Sangersequenzierung als *C. albicans* identifizieren [139].

So sollte die ITS1-ITS2-Region als PCR-Zielregion für die einzelnen Pilzweig- (Familien- oder Gattungenspezifischen) Reaktionen der fuPCR genutzt werden. Sie zeigte die gewünschten Eigenschaften einer hohen Kopienanzahl im Genom, einer hohen Anzahl an verfügbaren Sequenzen der zu detektierenden Pilze für die *in silico*-Analyse sowie des Vorkommens von konservierten gruppenspezifischen Regionen mit eingeschlossenen spezies- oder genusspezifischen Abschnitten.

### 3.2 Sammlung von rDNA-Sequenzen zum Design von fuPCR-Primern

Zur Identifizierung von zweigspezifischen Primerbindungsstellen für die einzelnen Zweige des fuPCR-Panels erfolgte im nächsten Schritt die Sammlung von ITS1-ITS2-Sequenzen aller Pilzspezies, die mittels fuPCR detektiert werden sollten (siehe Einleitung, Kapitel 1.1.3).

Die gewünschten DNA-Sequenzen wurden aus der NCBI-Datenbank GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) nach folgendem Prozedere extrahiert: Da jede Pilzfamilie bzw. -spezies mit einer eindeutigen taxonomischen Nummer (Taxonomy ID) assoziiert ist, wurde in der Suchmaske der „NCBI Taxonomy Homepage“ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html>) über die spezifische taxonomische Nummer auf die Nukleotid-Datenbank des jeweiligen Pilzes zugegriffen. Um ITS1-ITS2-Sequenzen zu selektieren, wurden für die Datenbankabfrage folgende Suchbegriffe verwendet:

- > ITS1
- > ITS2
- > internal transcribed spacer 1
- > internal transcribed spacer 2



Neben diesen Suchbegriffen, die konkret für ITS-Elemente stehen, wurden auch Suchbegriffe verwendet, die alternativ für den ITS1-ITS2-Abschnitt genutzt werden können. So ist die 5.8S-rDNA von den ITS1- und ITS2-Elementen umschlossen und Sequenzen, die mit 5.8S benannt wurden, konnten flankierend ITS-Sequenzen enthalten. Die 18S- und 28S-rDNA-Sequenzen konnten ebenfalls am 5'- bzw. und 3'-Ende weitere ITS-Sequenzen enthalten, weshalb ebenfalls folgende Suchbegriffe Anwendung fanden:

- > 18S (partial)
- > small subunit ribosomal RNA gene
- > 28s (partial)
- > large subunit ribosomal RNA gene
- > 5.8S
- > 5.8S ribosomal RNA gene

GenBank stellt eine frei zugängliche Datenbank der „International Nucleotide Sequence Database Collaboration“ dar. Sie ermöglicht zwar ein freies Hoch- und Herunterladen von Sequenzdaten, erfordert aber auch ein hohes Maß an Verantwortlichkeit in Bezug auf Hintergrundinformationen der Pilze, von denen diese Sequenzdaten stammen. Nach aktuellen Schätzungen sind trotzdem leider etwa 20 % der momentan in GenBank hinterlegten Datensätze falschen (Pilz-)Spezies zugeordnet [140-142]. Um zu vermeiden, dass Sequenzen verwendet wurden, die unbeabsichtigtweise mit falscher Speziesbezeichnung hinterlegt wurden und andere Pilzspezies beschreiben als eingetragen sind, wurde jede selektierte Sequenz über einen Homologievergleich mittels BLAST (siehe Kapitel 2.4.2) und Alignments zu Referenzsequenzen (Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) und American Type Culture Collection (ATCC)) verifiziert. Zudem wurden die gesammelten ITS1-ITS2-Sequenzen im Zuge dieser Überprüfung mit speziellen Pilz-Datenbanken verglichen, welche sich auf die Sammlung und Charakterisierung von Pilzen spezialisiert haben. Für diesen Abgleich wurde die Web-basierte Anwendung für paarweise Alignments (<http://www.westerdijkinstiute.nl/collections/BioloMICSSequences.aspx>) der „CBS-KNAW Culture Collection“ verwendet (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections>). Sequenzen, die einen Identitäts-Wert von über 95 % aufwiesen, wurden in die Datensammlung aufgenommen, Sequenzen mit geringerer Identität wurden verworfen.

Ein zusätzliches Problem im Zuge der Datenerfassung stellten abweichende Bezeichnungen und Namensänderungen von Pilzspezies dar. Die historische Klassifikation von Pilzen erfolgte meist auf Basis ihres morphologischen bzw. mikroskopischen Erscheinungsbildes. Probleme bei der Taxonomie der Pilze bereiteten unter anderem Pilze, die sich schwer in eine bestimmte Klasse oder Ordnung einreihen ließen, Namensänderungen von Pilzen oder Verschiebungen von Pilzen in andere Klassen [143]. So konnten die imperfekte (asexuelle) Form und die perfekte (sexuelle) Form eines Pilzes jeweils einen eigenen Namen tragen. Moderne molekularbiologische und phylogenetische Auswertetechniken erlauben heutzutage eine erneute Analyse dieser Pilzspezies und ermöglichen damit eine eindeutige taxonomische Verknüpfung und Klassifizierung [144]. Die

Taxonomie der Pilze ist daher zum jetzigen Zeitpunkt noch eine dynamische und fortschreitende Disziplin, die dementsprechend noch laufend zu Änderungen in deren Nomenklatur führt [145, 146].

Bei der Suche nach ITS1-ITS2-Sequenzen von Pilzen musste daher besonders auf abweichende Bezeichnungen von Pilzen geachtet werden, um sicherzustellen, dass alle möglichen Datensätze berücksichtigt würden. So waren beispielsweise *Cryptococcus laurentii* auch als *Papiliotrema laurentii* [147] und *Candida krusei* als *Pichia kudriavzevii* [148] in den Nukleotid-Datenbanken von NCBI abgespeichert. Andere Pilze wurden unter ihren anamorphen (asexuelles Stadium eines Pilzes oder Nebenfruchtform) Bezeichnungen hinterlegt, z. B. *Cryptococcus uniguttulatus* als *Filobasidium uniguttulatum*. Synonyme Bezeichnungen wurden beispielsweise für *Fusarium moniliforme* (*Fusarium verticillioides*) verwendet, zusätzlich zum existierenden Teleomorph (sexuelles Stadium eines Pilzes oder Hauptfruchtform) *Gibberella moniliformis* sowie wiederum dessen Synonym *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*) [149]. Tiefgreifende Namensänderungen innerhalb der letzten Jahre fanden unter anderem in der Gattung *Absidia* statt. So wurden einzelne Spezies dieses Genus aufgrund von physiologischen und phylogenetischen Analysen der Gattung *Lichtheimia* zugeordnet, und *Absidia corymbifera* wurde im Folgenden unter der Bezeichnung *Lichtheimia corymbifera* geführt [73, 150]. Diese synonymen Bezeichnungen und taxonomischen Veränderungen der Pilze wurden bei der Sammlung von ITS1-ITS2-Sequenzen berücksichtigt. So wurden insgesamt 1521 verschiedene ITS1-ITS2-Sequenzen in die Sammlung aufgenommen. Sie umfassten 71 Pilzspezies aus 13 Gattungen (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Anzahl der ITS1-5.8S-ITS2-Sequenzen für die verschiedenen Pilzspezies

Spezies	Taxonomy ID <sup>a</sup>	Sequenzen (n=)	Spezies	Taxonomy ID <sup>a</sup>	Sequenzen (n=)
<b>Absidia</b>	4828		<b>Lichtheimia</b>	688353	
<i>A. caerulea</i>	90261	11	<i>L. corymbifera</i>	42458	27
<i>A. glauca</i>	4829	14	<i>L. hyalospora</i>	420593	6
<i>A. repens</i>	90262	13	<i>L. ramosa</i>	688394	14
<i>A. spinosa</i>	126712	3			
			<b>Mucor</b>	4830	
<b>Aspergillus</b>	5052		<i>M. circinelloides</i>	36080	32
<i>A. flavus</i>	5059	35	<i>M. circinelloides</i> <i>f. circinelloides</i>	70416	16
<i>A. fumigatus</i>	746128	46	<i>M. circinelloides</i> <i>f. lusitanicus</i>	29924	10
<i>A. lentulus</i>	293939	5	<i>M. hiemalis</i>	64493	24
<i>A. nidulans</i>	162425	21	<i>M. racemosus</i>	4841	40
<i>A. niger</i>	5061	27			
<i>A. oryzae</i>	5062	34	<b>Penicillium</b>	5073	
<i>A. parasiticus</i>	5067	18	<i>P. brevicompactum</i>	5074	19
<i>A. terreus</i>	33178	70	<i>P. camemberti</i>	5075	37
<i>A. tubingensis</i>	5068	29	<i>P. chrysogenum</i>	5076	33
<i>A. versicolor</i>	46472	33	<i>P. commune</i>	36653	27
			<i>P. crustosum</i>	36656	37
<b>Candida</b>	1535326		<i>P. decumbens</i>	69771	7
<i>C. albicans</i>	5476	36	<i>P. expansum</i>	27334	33
<i>C. dubliniensis</i>	42374	31	<i>P. funiculosum</i>	28572	15
<i>C. glabrata</i>	5478	22	<i>P. marneffeii</i>	37727	27
<i>C. krusei</i>	4909	18			
<i>C. orthopsilosis</i>	273371	32	<b>Rhizomucor</b>	4838	
<i>C. parapsilosis</i>	5480	33	<i>R. pusillus</i>	4840	27
<i>C. tropicalis</i>	5482	27	<i>R. variabilis</i>	90265	27
<b>Cryptococcus</b>	5206		<b>Rhizopus</b>	4842	
<i>C. adeliensis</i>	92952	15	<i>R. microsporus</i>	58291	24
<i>C. albidus</i>	100951	12	<i>R. microsporus</i> <i>var. microsporus</i>	86635	13
<i>C. curvatus</i>	57679	7	<i>R. oryzae</i>	64495	41
<i>C. gattii</i>	1884637	13	<i>R. stolonifer</i>	4846	10
<i>C. laurentii</i>	5418	30			
<i>C. neoformans</i>	5207	14	<b>Scedosporium</b>	41687	
<i>C. neoformans</i> <i>var. grubii</i>	178876	17	<i>S. apiospermum</i>	563466	24
<i>C. neoformans</i> <i>var. neoformans</i>	40410	9	<i>S. boydii</i>	5597	26
<i>C. uniguttulatus</i>	5212	13	<i>S. prolificans</i>	41688	12
<b>Cunninghamella</b>	4852		<b>Trichosporon</b>	5552	
<i>C. bertholletiae</i>	90251	6	<i>T. asahii</i>	82508	28
<i>C. elegans</i>	4853	12	<i>T. asteroides</i>	82511	8
			<i>T. cutaneum</i>	5554	5
<b>Fusarium</b>	5506		<i>T. dermatitis</i>	129132	12
<i>F. moniliforme</i>	117187	30	<i>T. inkin</i>	82517	9
<i>F. oxysporum</i>	5507	35	<i>T. loubieri</i>	82519	11
<i>F. proliferatum</i>	948311	41	<i>T. mucoides</i>	82522	9
<i>F. solani</i>	169388	28	<i>T. mycotoxinivorans</i>	252803	13
			<i>T. ovoides</i>	82524	6

<sup>a</sup> Taxonomische Identifikationsnummer des NCBI (Taxonomy ID).

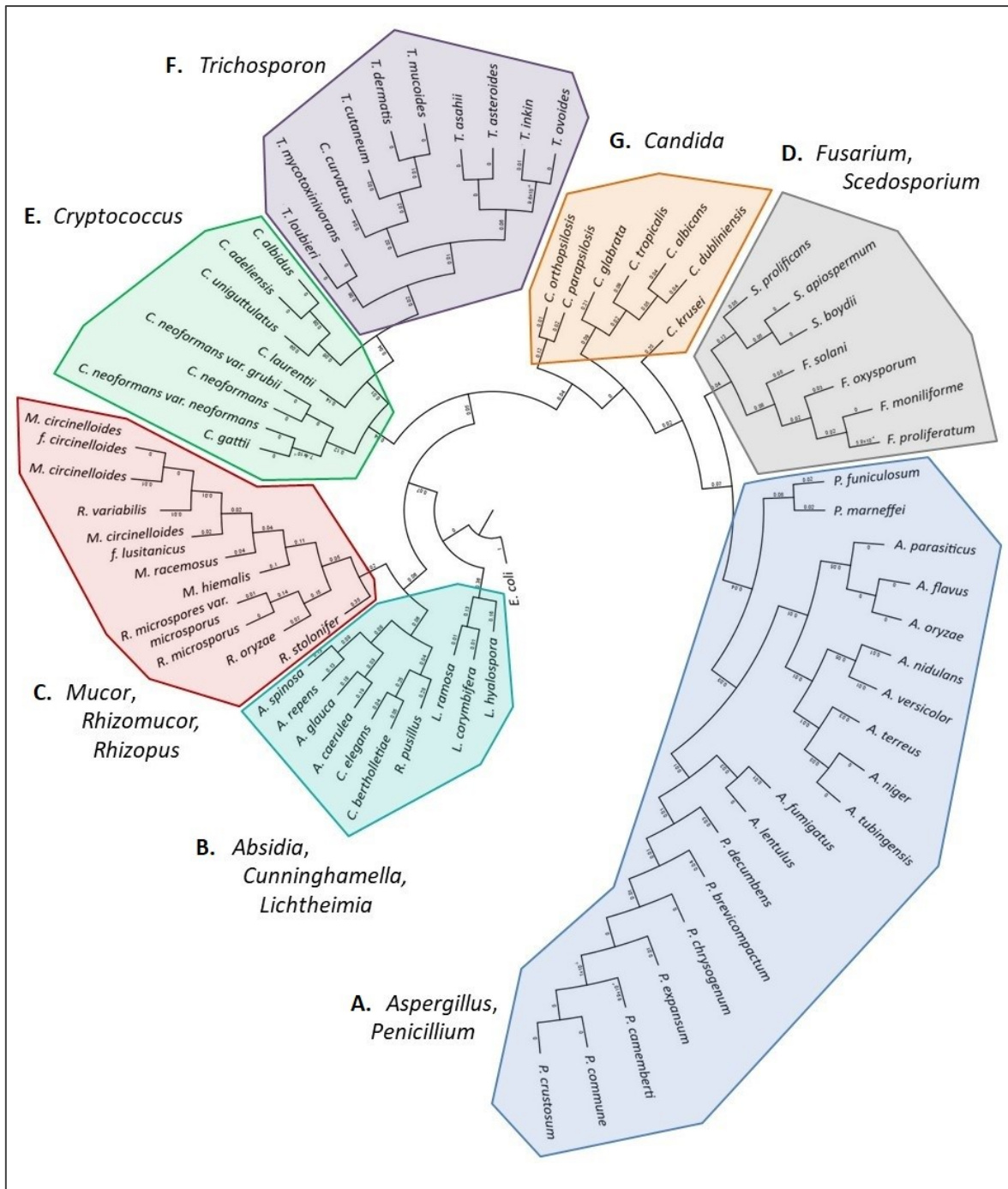
Die Sequenzen, die mit dazugehörigen Accession-Nummern im Anhang (Kapitel 8.1) aufgelistet sind (und über die Internetdatenbank des NCBI anhand ihrer Identifikationsnummern jederzeit heruntergeladen werden können), wurden für die Erstellung von gattungs-/genus- bzw. zweigspezifischen (Kapitel 3.4) und universellen Pan-Fungal Primern (Kapitel 3.5) verwendet.

### 3.3 Strukturierung der fuPCR

Aufgabe der fuPCR war die Detektion und Differenzierung von humanpathogenen Pilzen in klinischen Proben von immunsupprimierten Patienten. Das Detektionsspektrum des Assays bezog sich daher auf Pilze, die in Patienten mit hämatologischen Erkrankungen vorherrschend sind, und umfasste *Absidia* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp., *Lichtheimia* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Scedosporium* spp. und *Trichosporon* spp. (siehe Kapitel 1.1.3). Innerhalb eines PCR-Laufes sollten Proben auf dieses Spektrum an Pilzen hin getestet werden und dabei eine simultane Vordifferenzierung der Pilzgattungen erfolgen. Zu diesem Zweck wurden die Genera in sieben Reaktionen aufgeteilt und entsprechende genus- und zweigspezifische Forwardprimer entwickelt, um letztlich einen PCR-Assay zu liefern, der in der Routine einer mikrobiologischen Diagnostik einzusetzen ist.

Die Aufteilung dieser 13 Pilzgattungen für spezifische PCR-Reaktionen erfolgte anhand von drei Gesichtspunkten. Der erste Aspekt war eine Aufteilung der Pilze anhand ihrer medizinischen Bedeutung für immunsupprimierte Patienten. Dies beinhaltete sowohl die Häufigkeit der entsprechenden Pilze als Krankheitserreger gemessen an der Zahl an pathogenen Pilzkrankungen als auch den Schweregrad des Krankheitsbildes, sofern es zu einer Infektion mit dem entsprechenden Pilz gekommen war (siehe Kapitel 1.1.3). Der zweite Aspekt für die Aufteilung der Pilze war, die Genera einer gemeinsamen Ordnung zu bündeln, da diese sich in ihrem Erscheinungs- und Krankheitsbild ähneln. Der letzte Gesichtspunkt war eine Zusammenfassung von Pilzen, sofern diese auf genetischer Ebene in ihrer DNA-Sequenz nahe verwandt waren und demnach einen hohen Grad an Sequenz-Homologie aufwiesen.

Die genetischen Homologien der Pilze wurden anhand von multiplen Alignments des ITS1-5.8S-ITS2-Sequenzbereiches überprüft (siehe Anhang: Multiple ITS1-5.8S-ITS2-Alignments der Reaktionen A bis G). Die Verwandtschaft der verschiedenen Spezies konnte in einem phylogenetischen Baum visualisiert werden (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Phylogenetischer Baum von 71 Pilzspezies der fuPCR. Grundlage des phylogenetischen Baums ist ein multiples Sequenzalignment der ITS1-ITS2-Region, die die sieben zweigspezifischen PCRs A - G enthält.

Das multiple Alignment, welches als Basis für den phylogenetischen Baum diente, wurde mit dem Softwarepaket Geneious erstellt. Verwendet wurden die ITS1-5.8S-ITS2-Sequenzen von 72 Organismen (71 Pilze und ein Bakterium). Um den phylogenetischen Baum zu wurzeln, wurde als „Outgroup“ (ein Taxon mit einem entfernten phylogenetischen Verwandtschaftsgrad zu den analysierten Spezies) die ITS-Sequenz des Bakteriums *E. coli* (HM483393) verwendet [151, 152].

Die Sequenzen mit den dazugehörigen Accession-Nummern sind im Anhang aufgelistet (Kapitel 8.2).

Anhand der eingangs vorgestellten Gesichtspunkte konnten die 13 Pilz-Genera in einer der sieben Reaktionen (A bis F) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 18 sowie Abbildung 5).

**Tabelle 18:** Aufbau des fuPCR-Assays und Auflistung der nachzuweisenden Pilzgenera in den einzelnen Reaktionen

Reaktion	Pilz-Genera
A	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
B	<i>Absidia, Cunninghamella, Lichtheimia</i>
C	<i>Mucor, Rhizomucor, Rhizopus</i>
D	<i>Fusarium, Scedosporium</i>
E	<i>Cryptococcus</i>
F	<i>Trichosporon</i>
G	<i>Candida</i>

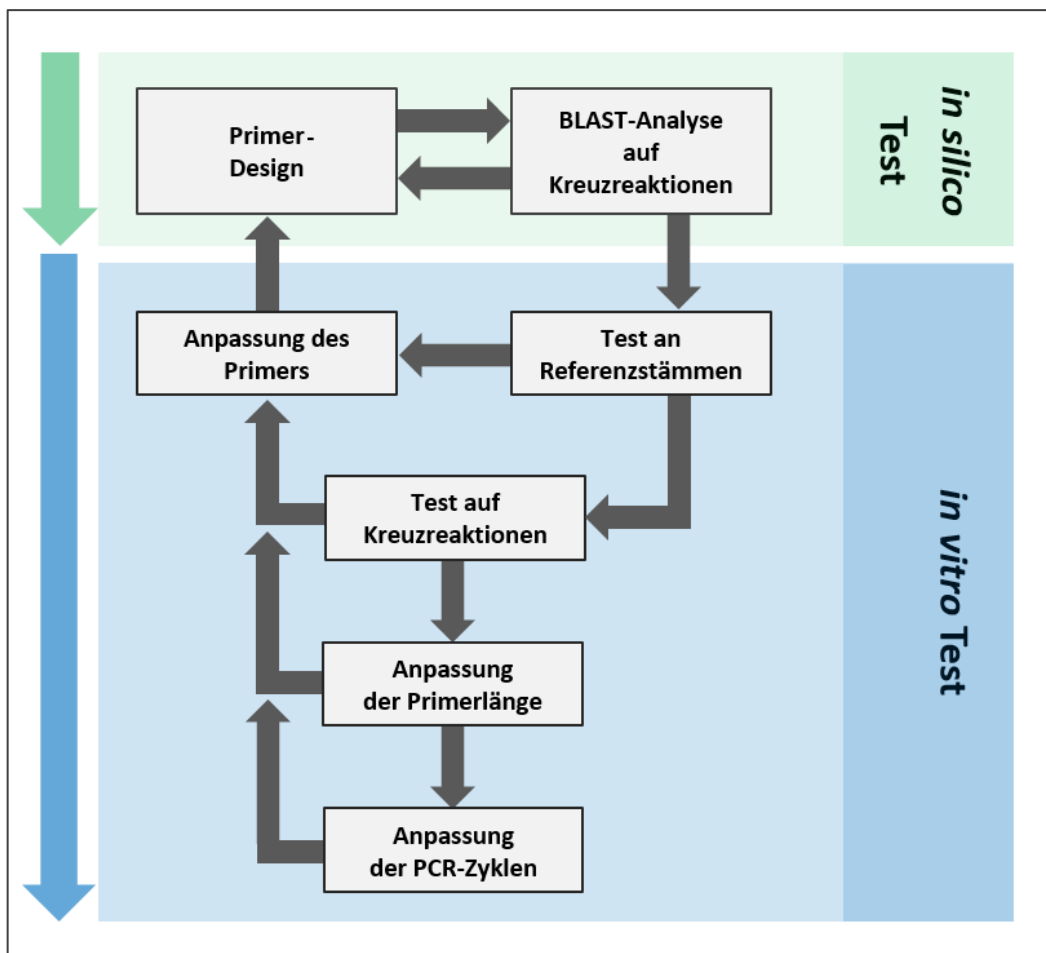
Die Schimmelpilze der Genera *Absidia*, *Cunninghamella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor* und *Rhizopus* gehören alle der Ordnung der Mucorales an, sollten aber im Rahmen der Vordifferenzierung aufgeteilt werden. *Absidia*, *Cunninghamella* und *Lichtheimia* zeigten sich auf genetischer Ebene stark miteinander verwandt und weisen einen hohen Grad an Sequenzhomologie auf. Sie wurden daher in einer Reaktion kombiniert (siehe Abbildung 5; Reaktion B, türkise Schattierung). *Rhizomucor* gehört genau wie *Lichtheimia* zur Familie der Lichtheimiaceae, wies aber auf genetischer Ebene eine höhere Sequenzhomologie zu *Mucor* und *Rhizopus* auf (siehe Abbildung 5; Reaktion C, rote Schattierung), welche beide wiederum zur Familie der Mucorineae gehören. Zudem haben die Genera *Mucor*, *Rhizomucor* und *Rhizopus* ein gemeinsames Erscheinungs- und Erkrankungsbild sowie einen ähnlichen Schweregrad im Verlaufe einer Infektion (rhino-zerebrale Infektionen). Daher wurden die Genera *Mucor*, *Rhizomucor* und *Rhizopus* in einer Reaktion (C) miteinander kombiniert und *Rhizomucor* nicht der Reaktion B zugeordnet. Fusarien und die Gattung *Scedosporium* wurden in Reaktion D kombiniert, da sie auf genetischer Ebene in ihrer DNA-Sequenz nah verwandt sind (siehe Abbildung 5; Reaktion D, graue Schattierung). *Trichosporon* und *Cryptococcus* spp. zeigten sich in der Betrachtung des ITS2-Sequenzbereiches nah miteinander verwandt (siehe Abbildung 5; Reaktion E, grüne Schattierung, sowie Reaktion F, lila Schattierung), verursachen jedoch unterschiedliche Krankheitsbilder im Verlaufe einer Infektion. Beide Genera wurden daher durch unterschiedliche Reaktionen detektierbar gemacht (Reaktion E, *Cryptococcus*; Reaktion F, *Trichosporon*). Infektionen mit *Candida* und *Aspergillus* stellen die häufigsten Infektionen in immunsupprimierten Patienten dar (siehe Kapitel 1, Einleitung). Aufgrund dieses hohen Gefährdungsrisikos sollten diese beiden Genera ebenfalls durch einzelne Reaktionen (Reaktion A, *Aspergillus*; Reaktion G, *Candida*) repräsentiert werden. Spezies des *Penicillium*-Genus wurden jedoch mit *Aspergillus* spp. einer

Reaktion kombiniert, da sie in ihrer DNA-Sequenz einen hohen Grad an Sequenzhomologie aufwies (siehe Abbildung 5; Reaktion A, blaue Schattierung) und sich das vermeintliche Krankheitsbild stark ähnelt (pulmunale Infektion).

Durch die Betrachtung der physiologischen und phylogenetischen Charakteristika der Pilze konnten die Pilze einer von sieben Reaktionen zugeordnet werden, um eine Untersuchungsmethode zu liefern, die in einer Routinediagnostik Anwendung finden kann. Die Aufteilung war ein zweckmäßiger Schritt für die erforderliche Generierung von genus- und zweigspezifischen Forwardprimern.

### 3.4 Entwicklung der zweig- und familienspezifischen fuPCR-Primer

Die Entwicklung der zweig- und familienspezifischen Primer für die fuPCR erfolgte nach einem festen Ablaufschema (siehe Abbildung 6), welches sich in zwei Phasen unterteilt:

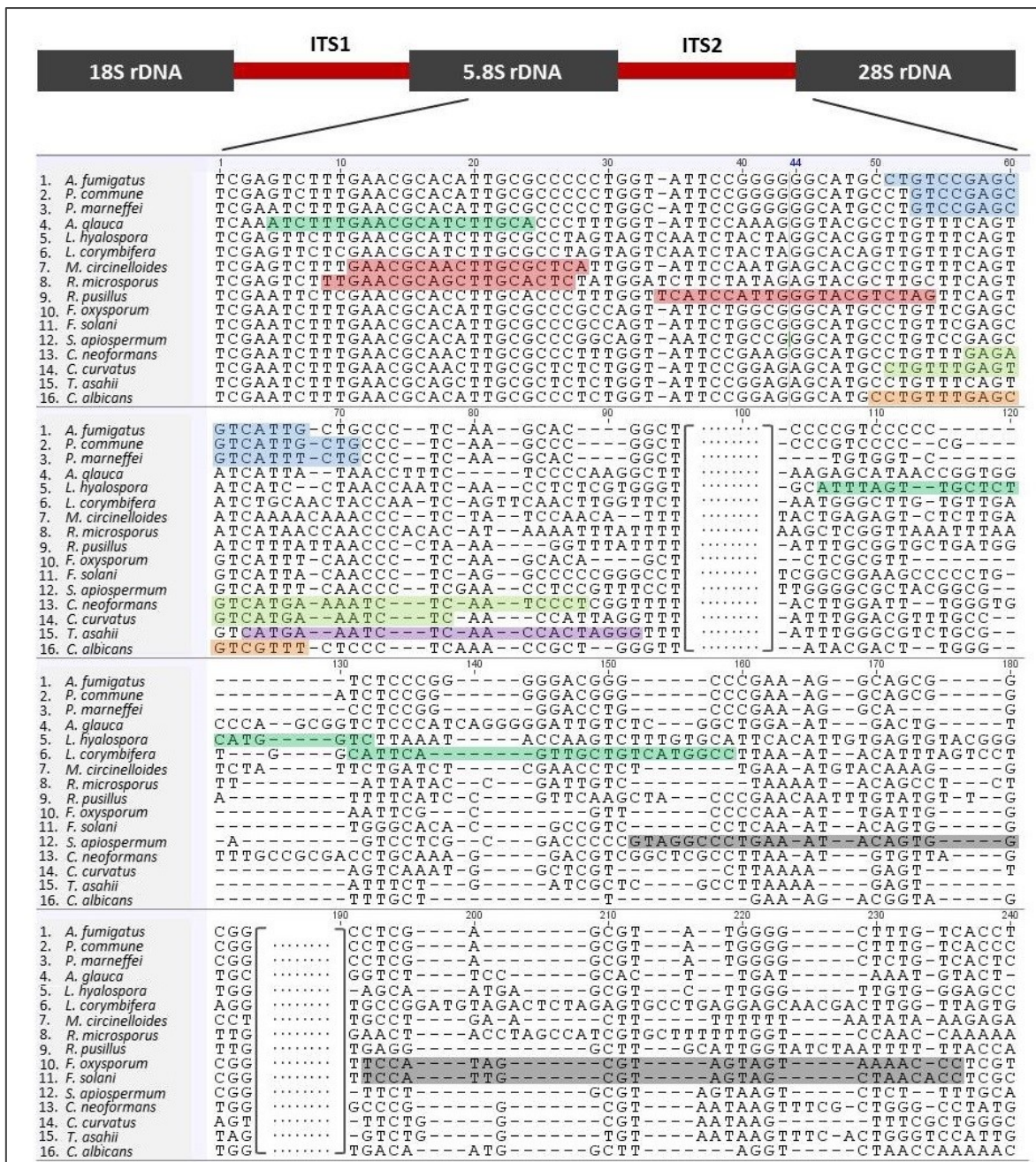


**Abbildung 6:** Flussdiagramm des Entwicklungsprozesses der zweig- und familienspezifischen Primer der fuPCR.

Für die *in silico*-Erstellung der Forward- und Reversprimersequenzen wurden zunächst multiple Sequenzalignments mit dem Geneious-Softwarepaket erstellt (siehe Kapitel 2.4.3). Benötigte Sequenzdaten wurden zuvor aus webbasierten Datenbanken gesammelt (siehe Kapitel 2.4.1). Die gewünschten Pilzfamilien bzw. -zweige wurden dabei in einem Sequenzalignment zusammengefasst und potentielle Bindestellen für die Primer identifiziert. Für jede der sieben Reaktionen (Reaktionen A - G, siehe Kapitel 3.3) wurde eine Kombination an Primern erstellt, die spezifisch die DNA der enthaltenen Pilzfamilien und -spezies amplifizieren sollte. Garantiert wurde



diese Spezifität dadurch, dass die Primer an DNA-Sequenzen binden, die für die jeweiligen Pilzfamilien und -spezies charakteristisch sind und nur in deren Genom zu finden sind (siehe Abbildung 7).



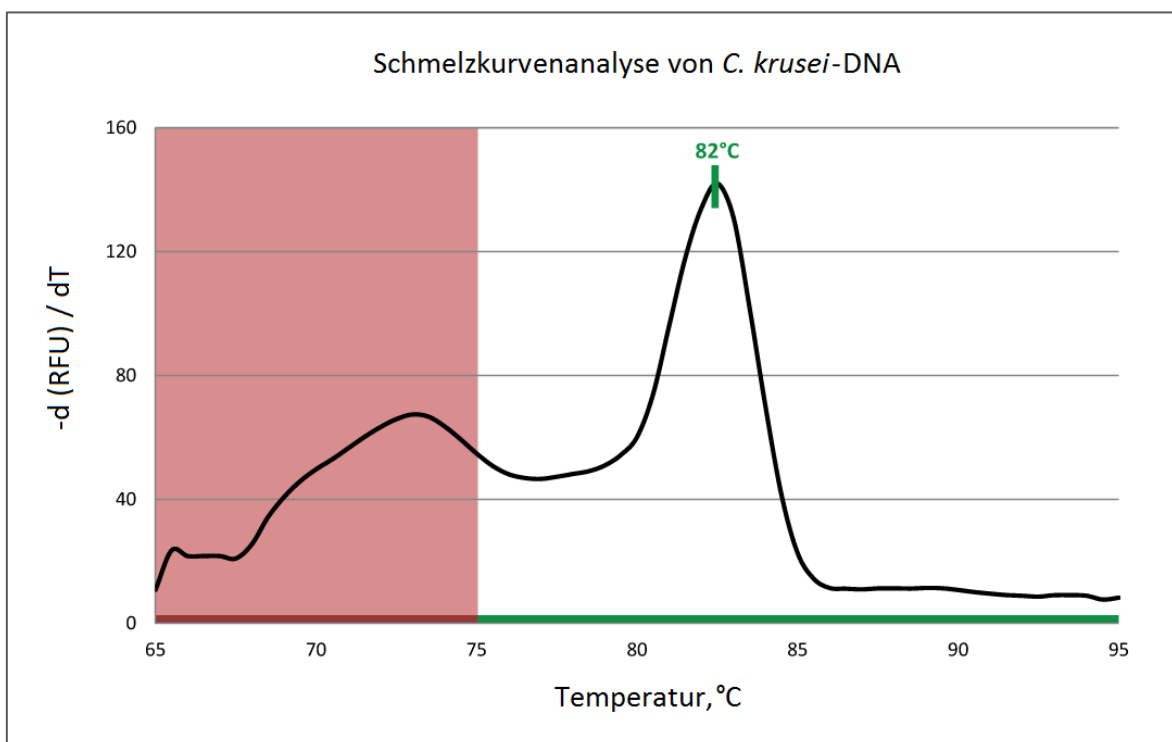
**Abbildung 7:** Multiples Alignment der 5.8S-ITS2-Region von 19 Pilzspezies. Die Bindungsregionen der familien- und zweigspezifischen Primer sind farblich hinterlegt (Primerbezeichnungen siehe Text).

Wie anhand des Alignments ersichtlich ist, sollten die Primer nur an die DNA-Sequenzen von Pilz-Spezies binden, die in ihren jeweiligen Reaktionen (siehe Kapitel 3.3, Tabelle 18) enthalten sind. Reaktion A (Blau; AspF, AspPenF1 & AspPenF2), Reaktion B (Türkis; Abs2, Lic1 & Lic2), Reaktion C (Rot; Muc1b, Muc2b & Muc3), Reaktion D (Grau; Fus1, Fus2 & Sce1), Reaktion E (Grün; Cry1 & Cry2), Reaktion F (Lila; Tri1) und Reaktion G (Orange; CanF). Eine Bindung an andere Spezies war durch die unterschiedliche Sequenzabfolge oder aufgrund von deletierten Sequenzabschnitten nicht möglich. In dem multiplen Alignment konnten so Bindestellen für 16 familien- und zweigspezifische Forwardprimer identifiziert werden, die zusammen jede der sieben Reaktionen

abdecken konnten. Für das anschließende Primerdesign wurden publizierte und allgemein angewandte Qualitätskriterien eingehalten [153-155]. DNA-Sequenzabschnitte der Pilzspezies wurden in die Software PrimerSelect (Version 5.08, DNASTAR, Madison, USA) geladen. Mit der Software PrimerSelect wurde ein Test der Primerpaare simuliert, um sie auf ihre Eignung innerhalb einer PCR hin zu überprüfen. Die zu überprüfenden Forward- und Reversprimer wurden in einem Primer-Katalog gespeichert und die Primer-Lokalisation erfolgte unter den voreingestellten Parametern der Software. Im Zuge des Primer-Designs wurde versucht, die gewünschte Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Primer auf die gleiche Temperatur einzustellen ( $60\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$ ). Die Länge eines Primers wurde so gewählt, dass die gewünschte Schmelztemperatur erreicht wurde, und betrug zwischen 17 und 26 Nukleotide. Für optimale PCR-Ergebnisse wurde versucht, einen GC-Gehalt des Primers (prozentualer Anteil an Guanin und Cytosin) von 40 bis 60 % einzuhalten. Sogenannte „AT-repeats“ (Di-Nukleotid-Wiederholungen von Adenin und Thymin) sollten nach Möglichkeit vermieden oder zumindest auf vier Di-Nukleotid-Wiederholungen begrenzt werden. Des Weiteren wurden Primer präferiert, die GC-Basen in den letzten fünf Positionen des 3'-Endes (GC-Klammer) aufwiesen, da dies die Spezifität der Primerbindung erhöht [156, 157]. Für jedes potentielle Primerpaar wurden zudem die dG-Werte für die Bildung von Primerdimeren und -Haarnadelstrukturen beurteilt. Der dG-Wert definiert die Menge an Energie, die benötigt wird, um die Sekundärstruktur der DNA vollkommen aufzulösen. Als Schwellenwert wurde ein dG-Wert von  $-9,0\text{ kcal/mol}$  definiert und Primer mit  $dG < -9,0\text{ kcal/mol}$  wurden verworfen. Mit PrimerSelect erstellte Primer wurden anschließend mit der web-basierten Software Primer3 gegengeprüft (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>; Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA) [158]. Um die Spezifität der Primer sicherzustellen, wurden die Primerpaare zudem mittels BLASTN-Homologievergleich analysiert (siehe Kapitel 2.4.2). So konnte eine Bindung an humane DNA ausgeschlossen und eine spezifische Bindung an die DNA der gewünschten Pilzspezies und -familien optimiert werden.

### 3.4.1 Auswertung der fuPCR-Schmelzkurvenanalysen

Sofern die Primer alle Qualitätsanforderungen der ersten Phase erfüllten, wurden sie weiterführend in der zweiten Phase des Entwicklungsprozesses *in vitro* getestet (siehe Abbildung 6, Überprüfung und Validation). Die potentiellen familienspezifischen Forwardprimer wurden in Kombination mit dem universellen Reversprimer ITS4.2 an der isolierten Pilz-DNA von Referenzstämmen getestet (siehe Kapitel 2.1.7.1). Die PCR-Daten (Amplifikation und Schmelzpunktanalyse) wurden mit der Bio-Rad CFX Manager Software (Version 2.1; Bio-Rad Laboratories) aufgezeichnet und anhand spezifischer Kriterien ausgewertet (siehe Abbildung 8).



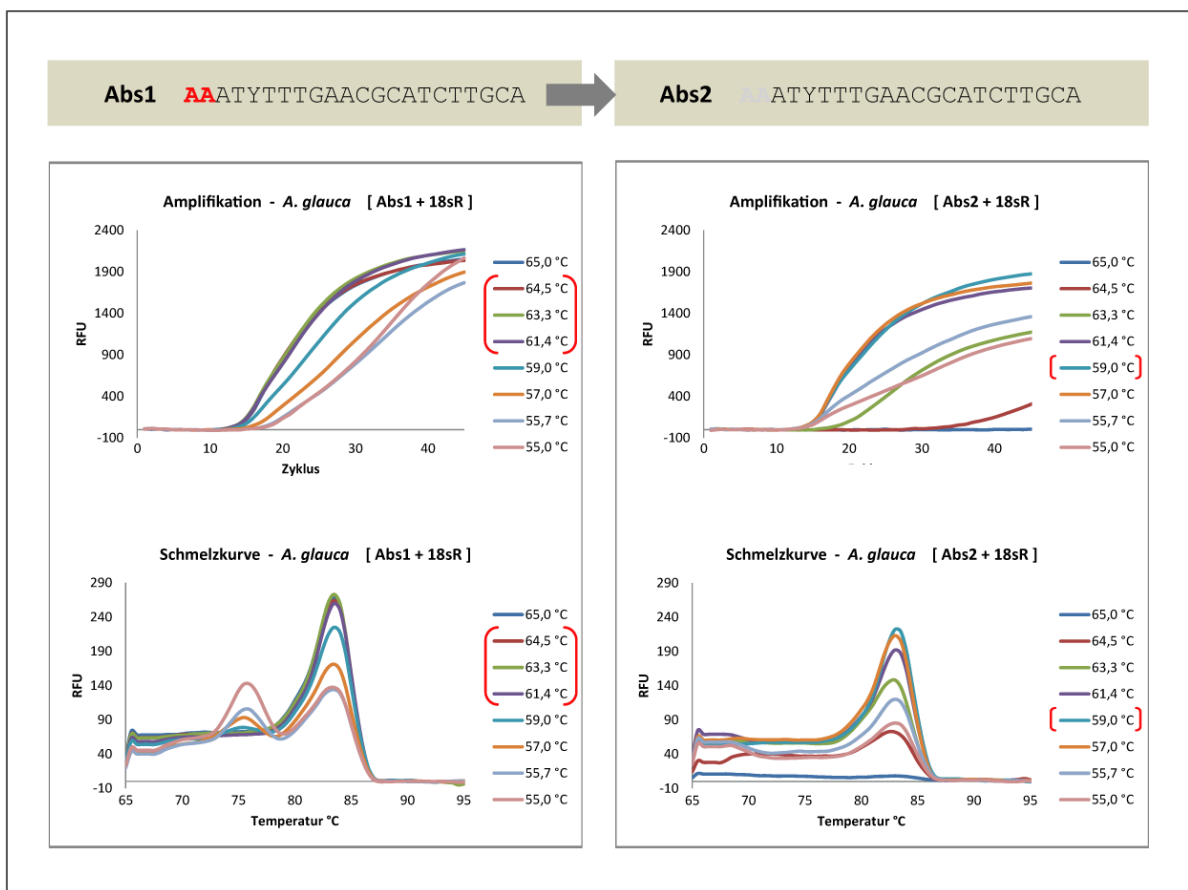
**Abbildung 8:** Schmelzkurvenanalyse mit PCR-Amplifikaten von *C. Krusei*-DNA mit den Primern CanF und ITS4.2.

Die Änderung der relativen Fluoreszenz wurde während der Schmelzpunktanalyse durch den PCR-Cycler automatisch aufgezeichnet (siehe Abbildung 8). Wie hier am Beispiel der *C. glabrata*-Schmelzkurvenanalyse zu sehen ist, wiesen PCR-Produkte von Pilz-DNA aufgrund ihrer größeren Länge einen höheren Schmelzpunkt auf (hier 82 °C) als Primerdimere. Im Zuge der Auswertung von PCR-Läufen wurden Schmelzpunkte aller PCR-Amplifikate im Bereich von 65 bis 75 °C als Primerdimere gewertet (rote Schattierung). Schmelzpunkte über dem Schwellenwert von 75 °C zeigten hingegen die Amplifikation von Pilz-DNA an. Für eine Verifizierung wurden diese PCR-Produkte aufgereinigt und sequenziert (siehe Kapitel 2.3.3 und 2.3.4).

### 3.4.2 Anpassung der Primerlänge

Die Schmelztemperaturen der PCR-Primer wurden durch das Geneious-Softwarepaket und durch die Software PrimerSelect bereits computerbasiert vorhergesagt. Nach Synthetisierung der Oligonukletide musste der tatsächliche Schmelzpunkt der Forwardprimer jedoch *in vitro* überprüft werden. In jeder Reaktion wurde neben den zu überprüfenden Forwardprimern der universelle Reverseprimer ITS4.2 verwendet. Der Reversprimer ITS4.2 wurde vor Beginn der Dissertation bereits in der AG Henrich für die PCR-Bedingungen angepasst und wurde im Zuge des Optimierungsprozesses nicht betrachtet.


Für jede Primerkombination wurde separat eine Temperaturgradienten-PCR durchgeführt, um gegebenenfalls die Länge der Oligonukleotide anpassen zu können. Unter Verwendung des in Kapitel 2.3.2.2 beschriebenen PCR-Profiles wurde dabei für die Hybridisierungstemperatur im Thermoblock des PCR-Cyclers ein Temperaturgradient von 10 °C (55 – 65 °C) erzeugt. Auf diese Weise konnten in einem Lauf verschiedene Hybridisierungstemperaturen ausgetestet werden, um die optimale Hybridisierungs-Temperatur zu bestimmen (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Schmelzkurvenanalyse der Gradienten-PCR zur Anpassung der Primer-Länge für die Amplifikation von *Absidia glauca*-DNA. Linke Seite: Profil für die Primerkombination Abs1 + ITS4.2. Rechte Seite: Primer Abs2 + ITS4.2.

Wie exemplarisch am Beispiel des *Absidia*-spezifischen Primers zu erkennen ist, musste eine Anpassung des familienspezifischen Forwardprimers Abs1 vorgenommen werden. Das optimale Amplifikationsprofil der PCR mit der Primerkombination Abs1 + ITS4.2 lag nicht wie gewünscht bei 60 °C, sondern zwischen 61,4 und 64,5 °C, woraufhin der Forwardprimer Abs1 um zwei Nukleotide im 5'-Bereich verkürzt wurde. Der gewünschte Temperaturbereich von 60,0 °C ( $\pm 1,0$  °C) konnte nach der Anpassung eingehalten werden, da nach einer wiederholten Gradienten-PCR das optimale Amplifikationsverhalten der PCR bei 59,0 °C lag. Nach diesem Vorbild wurden alle 16 familienspezifischen Forwardprimer getestet (siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Temperaturgradienten zur Anpassung der Primerlänge

Primer	Gradient <sup>a</sup>		Primer	Gradient <sup>a</sup>
AspF	59,0 °C		AspF	59,0 °C
AspPenF1	59,0 °C		AspPenF1	59,0 °C
AspPenF2	59,0 °C		AspPenF2	59,0 °C
<b>Abs1</b>	<b>61,4 - 64,5 °C</b>		<b>Abs2</b>	<b>59,0 °C</b>
Lic1	59,0 °C		Lic1	59,0 °C
Lic2	59,0 °C		Lic2	59,0 °C
<b>Muc1</b>	<b>61,4 - 63,3 °C</b>		<b>Muc1b</b>	<b>59,0 °C</b>
<b>Muc2</b>	<b>61,4 - 63,3 °C</b>		<b>Muc2b</b>	<b>59,0 °C</b>
Muc3	59,0 °C		Muc3	59,0 °C
Abs2	59,0 °C		Abs2	59,0 °C
Lic1	59,0 °C		Lic1	59,0 °C
Lic2	59,0 °C		Lic2	59,0 °C
Cry1	59,0 °C		Cry1	59,0 °C
Cry2	59,0 °C		Cry2	59,0 °C
Tri1	59,0 °C		Tri1	59,0 °C
CanF	59,0 °C		CanF	59,0 °C

<sup>a</sup> (+): Primer weist eine optimale Annealing-Temperatur im gewünschten Bereich auf.

Die Forwardprimer Abs1, Muc1 und Muc2 wiesen in Kombination mit dem Reversprimer ITS4.2 keine optimalen Amplifikationsprofile im gewünschten Temperaturbereich von 60,0 °C auf und mussten verkürzt werden. Ihr Temperaturoptimum lag zwischen 61,4 und 63,3 °C. Alle anderen Forwardprimer wiesen eine optimale Länge für die fuPCR auf und hybridisierten zwischen 59 und 61 °C.

### 3.4.3 Bestimmung der charakteristischen DNA-Schmelzpunkte der fuPCR-Produkte von 32 Pilzspezies

Um die charakteristischen Schmelzpunkte der jeweiligen PCR-Produkte pro Pilzspezies zu bestimmen, wurden die Forwardprimer mit dem universellen Reversprimer ITS4.2 an der isolierten Pilz-DNA von Referenzstämmen getestet (siehe Kapitel 2.1.7.1). Insgesamt wurden die verschiedenen Primerpaare mit der DNA von 32 unterschiedlichen Pilzspezies getestet und anhand der oben beschriebenen Kriterien ausgewertet. Pro Reaktion wurden 100 pg genomischer DNA unter dem in Kapitel 2.3.2.2 beschriebenen PCR-Profil eingesetzt. Durch Einsatz der DNA jeder Pilzspezies in jede der sieben fuPCR-Reaktionen (A - G) konnten unerwünschte Kreuzreaktionen detektiert werden. Die charakteristischen Schmelzpunkte der untersuchten Pilze sind der Tabelle 20 zu entnehmen.

**Tabelle 20:** Charakteristische Schmelzpunkte von Pilz-DNA in den PCR-Reaktionen A - G. Eine negative Amplifikation wurde mit (-) verzeichnet.

Spezies	PCR-Reaktion													
	A		B		C		D		E		F		G	
	[CT] <sup>b</sup>	MP <sup>c</sup>	[CT]	MP	[CT]	MP	[CT]	MP	[CT]	MP	[CT]	MP	[CT]	MP
<i>A. flavus</i> <sup>a</sup>	[22]	82,5+88,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i> <sup>a</sup>	[22]	81,5+89,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i> <sup>a</sup>	[22]	83,5+88,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. terreus</i> <sup>a</sup>	[20]	82,0+89,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i> <sup>a</sup>	[20]	83,5+89,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. funiculosus</i> <sup>a</sup>	[26]	83,5+88,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. crustosum</i> <sup>a</sup>	[22]	83,0+89,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i> <sup>a</sup>	[19]	83,0+89,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. janthinellum</i> <sup>a</sup>	[20]	83,5+91,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. spinulosum</i> <sup>a</sup>	[20]	83,0+89,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. commune</i> <sup>a</sup>	[21]	83,0+89,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. marneffei</i>	[23]	87,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. circinelloides</i>	-	-	[20]	79,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. racemosus</i>	-	-	[20]	78,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. oryzae</i>	-	-	[21]	80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. microsporus</i>	-	-	[24]	78,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. pusillus</i>	-	-	[20]	79,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. corymbifera</i>	-	-	-	-	[27]	81,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. glauca</i>	-	-	-	-	[22]	83,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. bertholletiae</i>	-	-	-	-	[21]	77,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. solani</i>	-	-	-	-	-	-	[22]	82,0	-	-	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-	[23]	80,5	-	-	-	-	-	-
<i>F. fujikuroi</i>	-	-	-	-	-	-	[20]	81,5	-	-	-	-	-	-
<i>S. prolificans</i>	-	-	-	-	-	-	[25]	84,0	-	-	-	-	-	-
<i>C. neoformans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	[20]	83,0	-	-	-	-
<i>T. mycotoxinivorans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[23]	81,5	-	-
<i>T. inkin</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[20]	80,0	-	-
<i>T. mucoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[20]	81,5	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[20]	82,5
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[21]	82,0
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[21]	86,5
<i>C. dubliniensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[20]	81,5
<i>Homo sapiens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Die PCR-Produkte der markierten Pilzspezies wiesen in Reaktion A einen charakteristischen Doppel-Peak in der Schmelzkurvenanalyse auf.

<sup>b</sup> [CT]: cycle threshold, Schwellenwert für die exponentielle Amplifikationsphase einer PCR.

<sup>c</sup> MP: charakteristischer Schmelzpunkt von PCR-Produkten während der Schmelzkurvenanalyse (Melting Peak).

Die Pilzspezies in den Reaktionen B bis G wiesen immer einen einzelnen charakteristischen Schmelzpeak auf, lediglich *Aspergillus* und *Penicillium* spp. zeigten in Reaktion A einen Doppelpeak. Eine Ausnahme in Reaktion A stellte der Schimmelpilz *P. marneffe* dar, da er einen einzelnen Schmelzpeak (87,0 °C) aufwies.

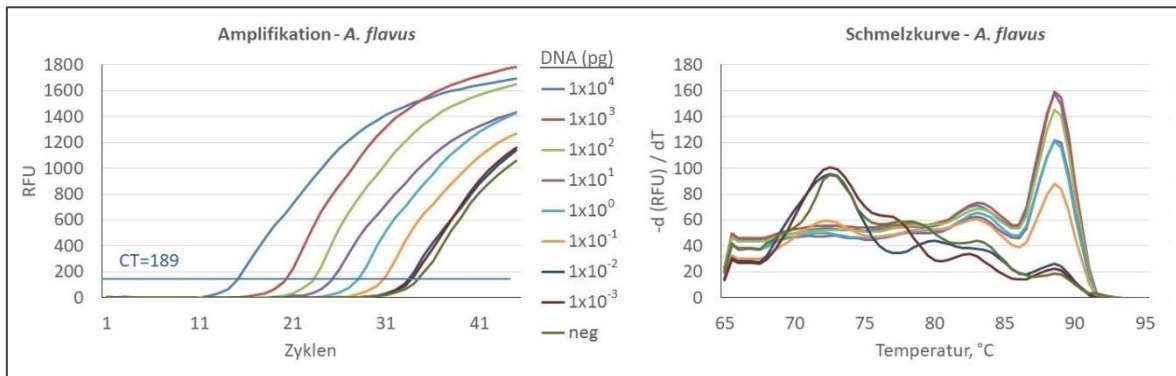
Die charakteristischen Schmelzpunkte mancher Pilzspezies konnten sich in ihren jeweiligen Reaktionen um bis zu 4,5 °C unterscheiden (Reaktion G; *C. dubliniensis* zu *C. krusei*). Anhand ihres Schmelzpunktes ließen sich in Reaktion B jedoch die Spezies *M. racemosus* (78,0 °C) und *R. microsporus* (78,0 °C) bzw. *M. circinelloides* (79,0 °C) und *R. pusillus* (79,0 °C) nicht unterscheiden, da sie identisch waren. In Reaktion F konnte anhand des Temperaturhöhepunktes keine genaue Differenzierung der Spezies *T. mycotoxinivorans* und *T. mucooides* (jeweils 81,5 °C) erfolgen. In Reaktion A wiesen drei *Penicillium*-Arten einen identischen Doppel-Peak von 83,0 + 89,0 °C auf (*P. spinulosum* und *P. commune* und *P. chrysogenum*) und konnten lediglich nach einer Sequenzierung differenziert werden. Der Schwellenwert der PCR (CT-Wert) wurde beim Einsatz von 100pg DNA bei den meisten Pilzspezies im 20. bis 21. Zyklus erreicht. Deutliche Unterschiede waren bei den Spezies *S. prolificans* (CT=25), *L. corymbifera* (CT=27) und *P. funiculosum* (CT=26) zu verzeichnen, was auf eine schlechtere Amplifikationseffizienz hindeutet. Insgesamt ließ sich zeigen, dass alle getesteten familienspezifischen Primer in Kombination mit dem universellen ITS4.2-Primer positive Amplikate von Pilz-DNA in ihren entsprechenden Reaktionen aufwiesen. Eine unerwünschte Amplifikation mit DNA von Pilzspezies einer anderen fuPCR-Reaktion sowie mit humaner DNA wurde nicht festgestellt.

#### **3.4.4 Optimierung der PCR-Bedingungen und Minimierung von Primerdimeren**

Nach Anpassung der Primerlänge erfolgte eine Optimierung der ursprünglichen PCR-Bedingungen. Wie bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben wurde, erfolgte die Auswertung eines PCR-Laufs anhand von Schmelzkurvenanalysen. Durch die Forward- und Reversprimer werden in einer PCR charakteristische PCR-Amplikate gebildet, die mittels der Schmelzkurvenanalyse visualisiert werden. Je geringer die Menge an Pilz-DNA in einer Probe war und damit die Menge der PCR-Matrize, desto später wurde die PCR positiv (Verzeichnung eines höheren CT-Wertes). War die Sensitivitätsgrenze einer PCR erreicht und die Menge an Pilz-DNA in einer Probe zu gering, um amplifiziert zu werden, stieg das Risiko der Bildung und Amplifikation von Primerdimeren in den höheren Zyklen der PCR. Bei einem Mangel an Bindungsregionen für die Primer nahm die Bindung an suboptimale Bindungsstellen (mit Fehlbasenpaarungen) zu, wodurch Primer eine Bindung mit sich selbst oder dem Gegenprimer eingehen konnten, die in der durchgeführten SYBR Green-Realtime-PCR dann ebenfalls detektiert wurden. Ausgangsbasis der fuPCR war das in Kapitel 2.3.2.2 beschriebene PCR-Profil mit insgesamt 45 PCR-Zyklen. Um das Ausmaß der Primerdimerbildung und die Sensitivität der einzelnen fuPCR-Reaktionen beurteilen zu können,

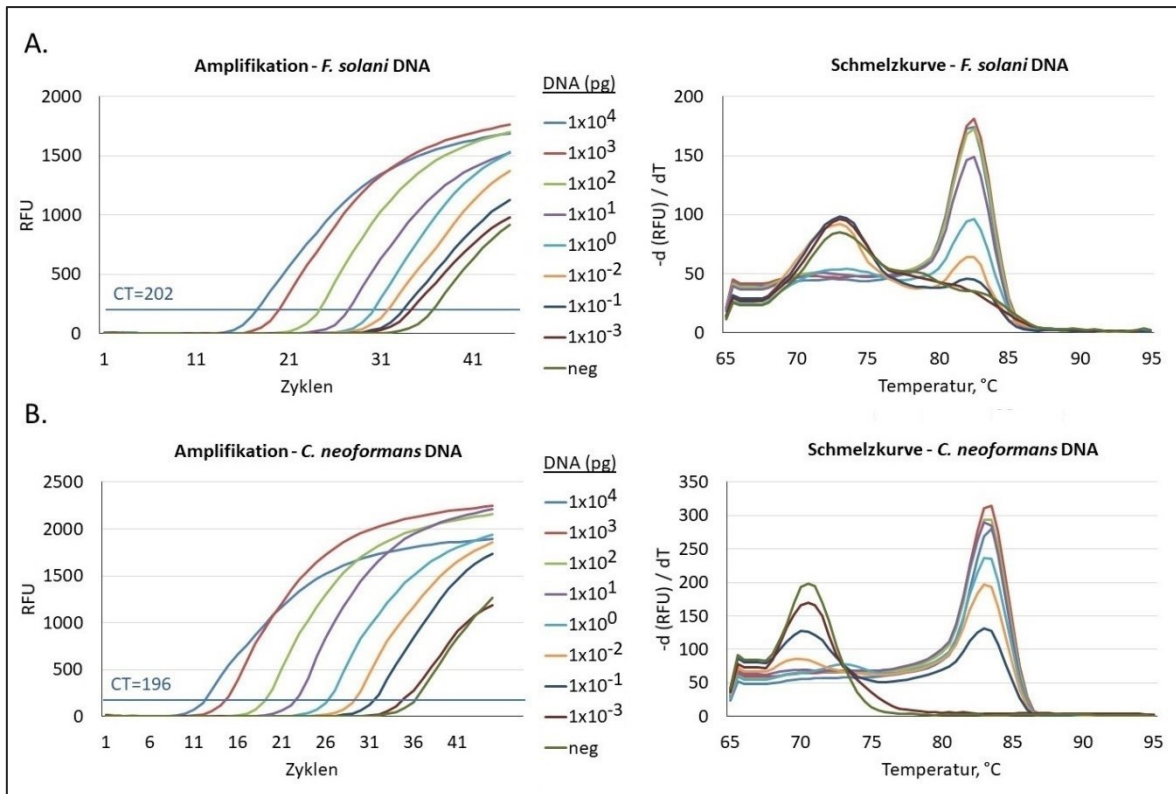


wurden von 10 ng aufgereinigter Pilz-DNA 1:10 Verdünnungsreihen erstellt (siehe Abbildung 10) und in der jeweiligen fuPCR-Reaktion getestet.



**Abbildung 10:** Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse seriell verdünnter *Aspergillus flavus*-DNA (Reaktion A).

Wie am Beispiel von *Aspergillus flavus* in der fuPCR-Reaktion A zu sehen ist, konnte bei Einsatz von  $2,5 \times 10^4$  bis  $2,5 \times 10^{-1}$  pg DNA noch ein charakteristisches Amplifikat mit Doppel-Peak bei  $82,5 \text{ °C} + 88,5 \text{ °C}$  festgestellt werden (siehe Abbildung 10). Bei einer Einsaat von  $1 \times 10^{-2}$  und  $1 \times 10^{-3}$  pg DNA wurde die PCR erst im 34ten Zyklus positiv und beide Schmelzkurven zeigten hauptsächlich Primerdimere ( $72,5 \text{ °C}$ ) an. Die charakteristischen Schmelzpunkte von  $82,5 \text{ °C} + 88,5 \text{ °C}$  waren im Gegenzug nur noch schwach zu erkennen. Da die charakteristischen PCR-Produkte und damit die DNA von *A. flavus* aufgrund der Primerdimerbildung bereits ab dem 30ten Zyklus nicht mehr identifiziert werden konnten, war die Durchführung von 45 Zyklen nicht zielführend. Die PCR-Bedingungen wurden daher von 45 auf 40 Zyklen herabgesetzt. Da Reaktion G (*Candida*) im 36. Zyklus noch positiv wurde und ein charakteristisches Amplifikat aufwies, wurden die PCR-Bedingungen nicht weiter auf 35 Zyklen herabgesenkt. Die Bildung von Primerdimeren war ebenfalls in Reaktion E (Forwardprimer Cry1 und Cry2) und Reaktion D (Forwardprimer Fus1, Fus2 und Sce1) zu erkennen (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse seriell verdünnter Pilz-DNA. **A;** Reaktion D (*F. solani*-DNA) und **B;** Reaktion E (*C. neoformans*-DNA).

Wie in Abbildung 11.A zu erkennen ist, konnte bei einer Einsaat von  $2,5 \times 10^4$  bis  $2,5 \times 10^0$  pg *F. solani*-DNA in Reaktion D ein Amplifikat mit einem charakteristischen Schmelzpunkt von  $82,0$  °C festgestellt werden. Jedoch bildete sich bereits bei Einsatz von nur  $2,5 \times 10^{-1}$  pg DNA ein deutliches Primerdimer ( $72,5$  °C) aus, wohingegen das gewünschte PCR-Produkt ( $82,0$  °C) nur noch schwach sichtbar war. Bei einer Einsaat von  $2,5 \times 10^{-2}$  und  $2,5 \times 10^{-3}$  pg DNA konnte kein eindeutiges Amplifikat mehr festgestellt werden und die PCR wurde erst im 33ten Zyklus positiv.

In Reaktion E (*C. neoformans*, siehe Abbildung 11.B) konnte bereits bei einer Einsaat von  $2,5 \times 10^{-1}$  pg DNA neben dem gewünschten PCR-Produkt die Bildung eines Primerdimers mit einem Schmelzpunkt von  $71,0$  °C beobachtet werden. Bis zu einer DNA-Konzentration von  $2,5 \times 10^{-2}$  pg DNA war das gewünschte PCR-Produkt mit einem Schmelzpunkt von  $83,0$  °C noch zu beobachten. Ab Zyklus 34 ( $2,5 \times 10^{-3}$  pg DNA) konnte hingegen kein charakteristisches Amplifikat mehr identifiziert werden, jedoch war das Primerdimer außerordentlich stark ausgeprägt.

In den Reaktionen B (*Absidia*, *Lichtheimia* & *Cunninghamella*), C (*Mucor*, *Rhizomucor* & *Rhizopus*), F (*Trichosporon*) sowie G (*Candida*) wurde selbst unter Abwesenheit von Pilz-DNA als Amplifikationsmatrize keine Bildung von Primerdimeren beobachtet.

### 3.4.5 Austestung der Sensitivitätsgrenzen

Um die Sensitivität jeder Einzelreaktion der fuPCR zu testen und um einen Eindruck davon zu erhalten, wie sich die Primer in klinischen Materialien verhalten (Matrix-Effekt), wurde die DNA von sieben Pilzspezies isoliert, wobei jeder dieser Pilze exemplarisch für eine der sieben Gruppen (Reaktionen A - G) stand. Auf Pilz-DNA negativ getestete klinische Proben (Rachenabstriche, Serum und EDTA-Blut) sowie reiner Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) wurden anschließend mit Verdünnungen (0,025 pg – 250 pg DNA) dieser Pilz-DNAs beimpft und aufgearbeitet (siehe Tabelle 21).

**Tabelle 21:** Detektionslimit der sieben familienspezifischen PCRs

Reaktion	Spezies	Referenzstamm	Minimale Menge an Pilz-DNA [pg/PCR]			
			Puffer	Rachen- Abstrich	EDTA- Blut	Blut- Serum
A	<i>A. fumigatus</i>	Instand (RV2 St. 4 / 06)	2,5	2,5	2,5	2,5
B	<i>R. oryzae</i>	DSM 854	2,5	25	2,5	2,5
C	<i>A. glauca</i>	DSM 811	25	25	25	25
D	<i>F. solani</i>	ATCC 36031	25	25	25	25
E	<i>C. neoformans</i>	Instand (RV2 St. 1 / 09)	0,25	0,25	0,25	0,25
F	<i>T. inkin</i>	Instand (St. 3 / 08)	0,25	0,25	0,25	0,25
G	<i>C. albicans</i>	Instand (RV3 St. C / 10)	2,5	2,5	2,5	2,5

PCRs spezifisch für *Cryptococcus* spp. (Reaktion E) und *Trichosporon* spp. (Reaktion F) zeigten die höchste Sensitivität und waren noch in der Lage, 0,25 pg an Pilz-DNA zu detektieren. Reaktionen spezifisch für *Aspergillus* spp. und *Penicillium* spp. (Reaktion A) sowie *Candida* spp. (Reaktion G) wurden erst bei DNA-Mengen  $\geq 2.5$  pg positiv. Dahingegen konnten in den Reaktionen C (*Absidia* spp., *Lichtheimia* spp. & *Cunninghamella* spp.) und D (*Fusarium* spp. & *Scedosporium* spp.) erst positive Ergebnisse erzielt werden, wenn Pilz-DNA  $\geq 25$  pg enthalten war. In Reaktion B (*Mucor*, *Rhizomucor* und *Rhizopus*) wurde ein Matrix-Effekt deutlich. Während in EDTA-Blut und Blutserum noch 2,5 pg an Pilz-DNA nachgewiesen werden konnte, war die PCR an Rachenabstrichen bereits bei 25 pg an ihrem Detektionslimit angelangt.

### 3.4.6 Speziesspezifische Sonden für *Aspergillus* und *Candida*

Im Zuge des Primerdesigns waren 16 familien- und speziesspezifische Forwardprimer zum Nachweis von Pilz-DNA neu entwickelt worden, die auf sieben verschiedene Reaktionen der fuPCR aufgeteilt worden waren und als „First Line“-PCR eingesetzt werden sollten. Da *Aspergillus* und *Candida* erwartungsgemäß die am häufigsten nachzuweisenden Spezies darstellen würden [4, 17, 83], sollten *Aspergillus*- und *Candida*-positive Proben in einer nachgeschalteten TaqMan-PCR analysiert werden, die als „Second Line“-PCR zur Identifizierung der häufigsten *Aspergillus*- und *Candida*-Spezies dient.

Für *Aspergillus* und *Candida* wurden jeweils vier speziesspezifische TaqMan-Sonden verwendet: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* sowie *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* und *C. krusei*. Die Sonden hybridisierten innerhalb der durch die Primer AspF + ITS4.2 (*Aspergillus*) bzw. CanF + ITS4.2 (*Candida*) amplifizierten ITS2-Bereiche.

Die ursprünglichen SONDENSEQUENZEN basierten auf publizierten Daten von Schabereiter-Gurtner et al. [112] und wurden entsprechend den Vorgaben der fuPCR gemäß Kapitel 3.4 angepasst. Die TaqMan-PCRs wurden mit 10ng isolierter genomischer DNA pro Reaktion unter den in Kapitel 2.3.2.2 angegebenen Bedingungen (siehe Tabelle 22) getestet.

**Tabelle 22:** Zusammenfassung der Testkriterien für die familienspezifischen Forwardprimer und speziesspezifischen Sonden

Primer / Sonde	Kreuzreaktivität <sup>a</sup>		Oligo- Länge <sup>b</sup>	Primerdimer <sup>c</sup>	
	Pilze	Humane DNA		CT-Wert	DNA- Einsaat/PCR
<b>Primer <sup>d</sup></b>					
AspF	-	-	+	34	0,01 pg
AspPenF1	-	-	+	34	0,01 pg
AspPenF2	-	-	+	34	0,01 pg
Abs2	-	-	+	-	-
Lic1	-	-	+	-	-
Lic2	-	-	+	-	-
Muc1b	-	-	+	-	-
Muc2b	-	-	+	-	-
Muc3	-	-	+	-	-
Sce1	-	-	+	31	0,1 pg
Fus1	-	-	+	31	0,1 pg
Fus2	-	-	+	31	0,1 pg
Cry1	-	-	+	29	0,1 pg
Cry2	-	-	+	29	0,1 pg
Tri1	-	-	+	-	-
CanF	-	-	+	-	-
<b>Sonden <sup>e</sup></b>					
S-Afla	-	-	+		
S-Afum	-	-	+		
S-Anig	-	-	+		
S-Ater	-	-	+		
S-Calb	-	-	+		
S-Cdub	-	-	+		
S-Cgla	-	-	+		
S-Ckru	-	-	+		

<sup>a</sup> Keine Kreuzreaktivität feststellbar: (-); vorhandene Kreuzreaktivität: (+).

<sup>b</sup> Primerlänge optimal: (+); suboptimale Primerlänge (-).

<sup>c</sup> Sichtbare Primerdimere: Angabe des CT-Wertes und der minimalen DNA-Menge ab Ausbildung von Primerdimeren in der Reaktion; keine erkennbaren Primerdimere: (-).

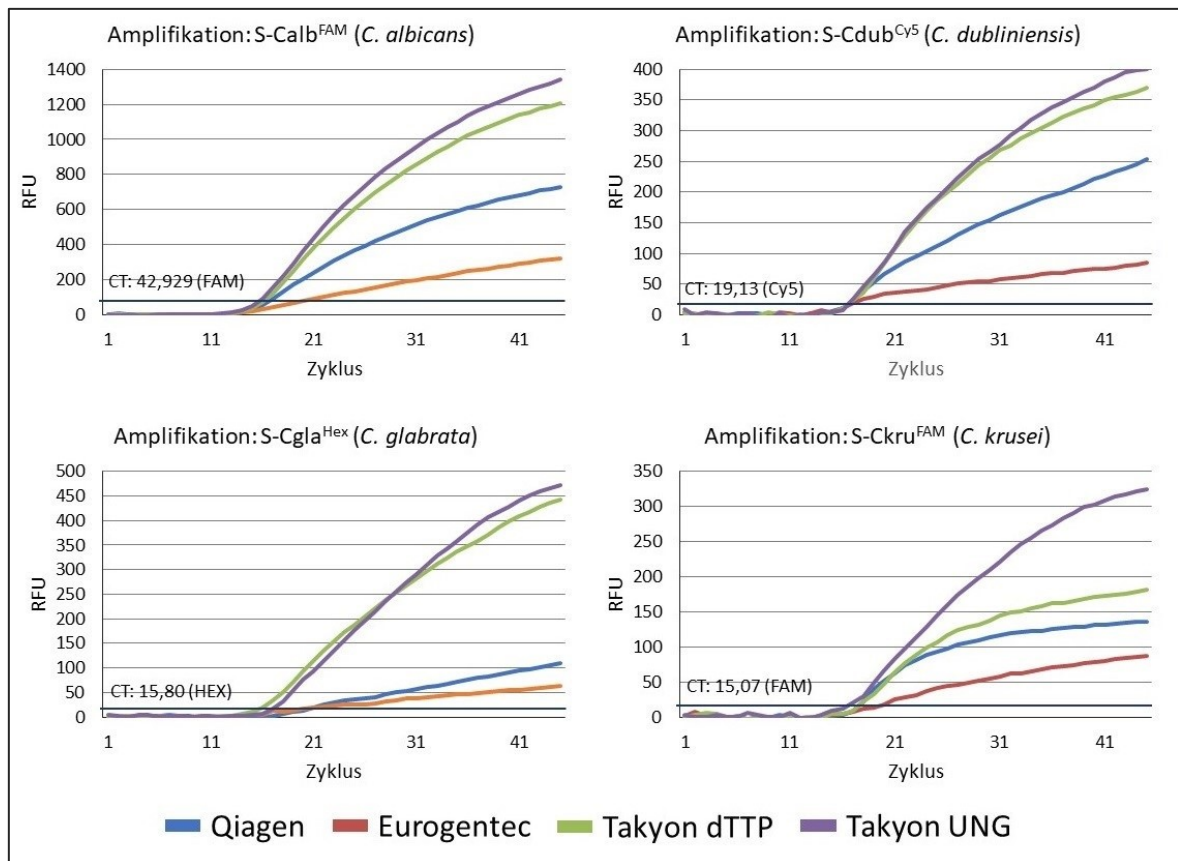
<sup>d</sup> Testung der Primer in PCR mit ITS4.2-Reversprimer.

<sup>e</sup> Testung der *Aspergillus*-Sonden (S-Axxx) in [AspF + ITS4.2]-PCR und der *Candida*-Sonden (S-Cxxx) in [CanF + ITS4.2]-PCR.

Die Sonden wurden hinsichtlich ihrer Oligonukleotidlänge und ihrer Ausbildung von Primerdimeren getestet. Neben den für sie korrespondierenden Pilzspezies wurden die Sonden zudem mit DNA von anderen Pilzen auf Kreuzreaktivitäten getestet (siehe Kapitel 2.1.7.1). Jede Sonde war in der Lage, die DNA der auf sie abzielenden Pilzspezies zu detektieren. In keiner Reaktion wurde eine Kreuzreaktivität mit anderen Pilzen beobachtet.

Vier unterschiedliche PCR-Mastermixe (Takyon No Rox Probe MasterMix dTTP, Takyon No Rox Probe MasterMix UNG, QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit, Eurogentec qPCR Master Mix No Rox) wurden für die TaqMan-PCRs ausgetestet. In jeder Reaktion wurde 5 pg *Aspergillus*- (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* & *A. terreus*) oder *Candida*-DNA (*C. albicans*, *C. dubliniensis*,

*C. glabrata* & *C. krusei*) als Amplifikationsmatrize unter den in Kapitel 2.3.2.2 angegebenen Bedingungen eingesetzt (siehe Tabelle 15). In Abbildung 12 sind die Amplifikationsdaten für die TaqMan-Reaktionen der vier *Candida*-Spezies dargestellt.



**Abbildung 12:** Austestung vier verschiedener Mastermixe für den Einsatz mit TaqMan-Sonden.

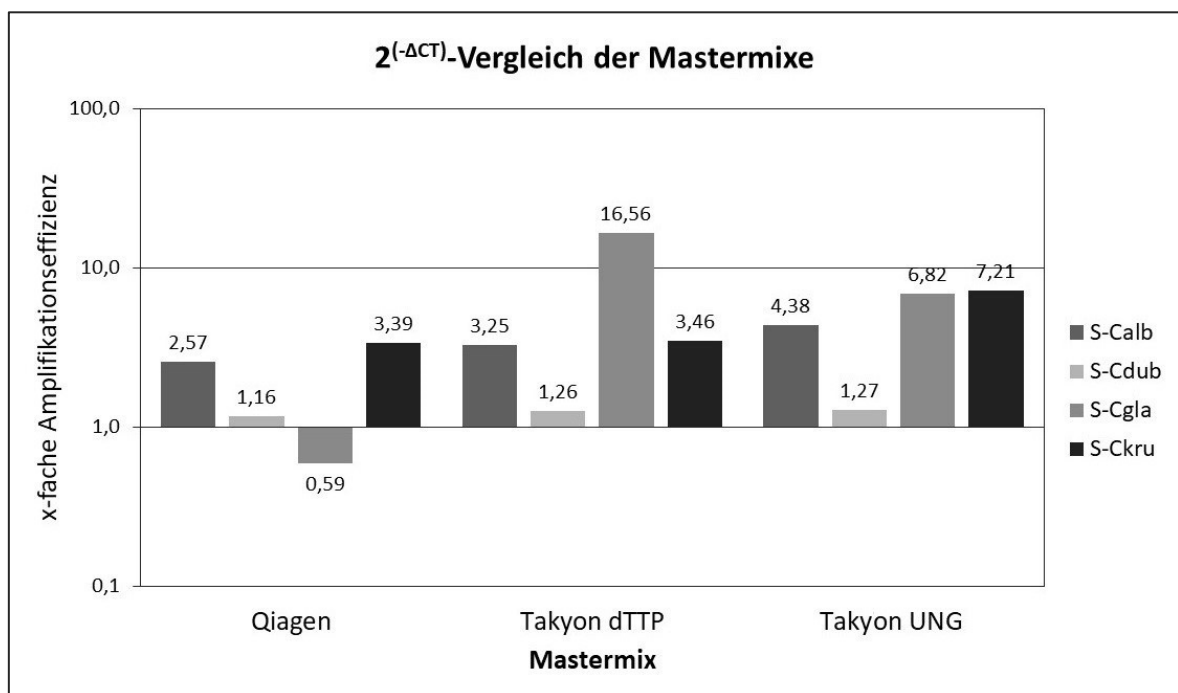
Wie anhand von Abbildung 12 ersichtlich ist, wurzeln die Amplifikationskurven unter Verwendung der verschiedenen Mastermixe zwar gleich, der Eurogentec-MasterMix lieferte die schlechteste PCR-Leistung aller vier getesteten Mixe. Das Amplifikationsprofil zeigte für jeden Sonden-Mix ein lineares Verhalten und geringe relative Fluoreszenzunterschiede (RFU-Werte) an. Eine ähnliche lineare Amplifikation der DNA zeigte sich bei Verwendung des Qiagen-Mixes in allen vier Reaktionen. Die Verwendung der Takyon-dTTP- und -UNG-Mixe hingegen führte zu einer logarithmischen Amplifikation von *C. albicans* (Sonde: S-Calb), *C. dubliniensis* (Sonde: S-Cdub) und *C. krusei* (Sonde: S-Ckru) in den jeweiligen TaqMan-PCRs. Lediglich die Amplifikation von *C. glabrata*-DNA (Sonde: S-Cgla) verlief eher linear für beide Mixe. Jedoch verzeichneten der Takyon-dTTP- und -UNG-Mix durchweg höhere relative Fluoreszenzunterschiede (RFU-Werte). Neben den Amplifikationsprofilen wurden die Unterschiede in den getesteten Mixen zudem anhand der CT-Werte deutlich (siehe Tabelle 23).

**Tabelle 23:** CT-Werte für den Vergleich der TaqMan-Mastermixe

Sonde <sup>a</sup>	Mastermix							
	Eurogentec		Qiagen		Takyon dTTP		Takyon UNG	
	CT	2 <sup>(-ΔCT)</sup>	CT	2 <sup>(-ΔCT)</sup>	CT	2 <sup>(-ΔCT)</sup>	CT	2 <sup>(-ΔCT)</sup>
S-Calb <sup>FAM</sup>	<b>16,85</b>	-	<b>15,49</b>	2,57	<b>15,15</b>	3,25	<b>14,72</b>	4,38
S-Cdub <sup>Cy5</sup>	<b>16,96</b>	-	<b>16,74</b>	1,16	<b>16,63</b>	1,26	<b>16,61</b>	1,27
S-Cgla <sup>Hex</sup>	<b>19,58</b>	-	<b>20,34</b>	0,59	<b>15,53</b>	16,56	<b>16,81</b>	6,82
S-Ckru <sup>FAM</sup>	<b>19,24</b>	-	<b>17,48</b>	3,39	<b>17,45</b>	3,46	<b>16,39</b>	7,21

<sup>a</sup> angeregter Farbkanal.

Die CT-Werte des Takyon-dTTP und -UNG-Mixes aller vier Sonden unterschieden sich im Mittelwert um 0,7 Zyklen. Für Reaktionen mit der Sonde S-Cgla konnten die Qiagen- und Eurogentec-Mixe den Schwellenwert jedoch erst deutlich später erreichen (3,5 bzw. 2,8 Zyklen). Da der Eurogentec-Mastermix in der Routine-Diagnostik für TaqMan-PCRs zum Nachweis von Bakterien Anwendung findet, wurde dieser Mix für einen Vergleich der 2<sup>(-ΔCT)</sup>-Werte [159, 160] als Referenzwert gesetzt (siehe Abbildung 13).



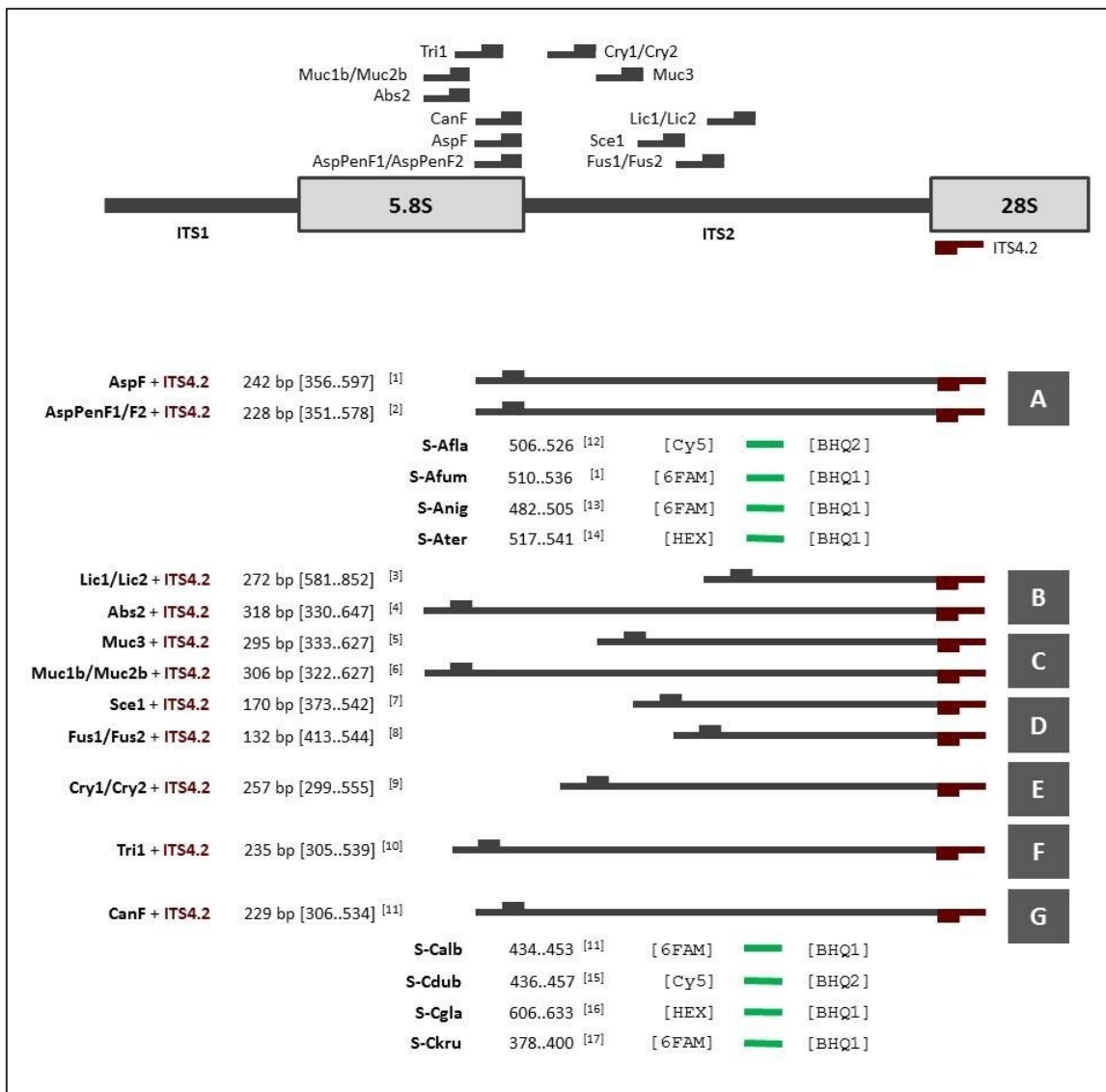
**Abbildung 13:** x-fache Verbesserung der Amplifikation von *Candida* spp. bei Verwendung verschiedener TaqMan-Mixe im Vergleich zum Eurogentec Mastermix (No ROX).

Die Amplifikationseffizienz des Quiagen-Mixes ist der des Eurogentec-Mixes um ein 1,16- bis 3,39-Faches überlegen, lediglich die Reaktion mit der *C. glabrata*-spezifischen Sonde liefert für den Qiagen-Mix eine schlechtere Leistung (0,59). Die Effizienz der *C. albicans*-TaqMan-PCR, *C. dubliniensis*-TaqMan-PCR und *C. krusei*-TaqMan-PCR war bei Verwendung des Takyon-UNG-Mixes jeweils am höchsten, lediglich die *C. glabrata*-TaqMan-Reaktion mit dem Takyon-dTTP-Mix lieferte einen besseren Wert. Durch die generell höhere Effizienz der TaqMan-PCRs mit dem Takyon-UNG-Mix wurde dieser Reaktionsmix für die weiteren TaqMan-PCRs genutzt.

### **3.4.7 Übersicht über die „First Line“-fuPCR-Primer und „Second Line“-TaqMan-Sonden**

Die Länge der Primer und Sonden war erfolgreich auf das Temperaturprofil der fuPCR angepasst worden. Alle Primer und Sonden waren nun in ihren jeweiligen PCR-Reaktionen frei von einer Kreuzreaktivität mit der DNA von anderen getesteten Pilzen. Eine Amplifikation von humaner DNA war ebenfalls nicht zu verzeichnen. Lediglich die Primer der Reaktionen A, D und E wiesen noch eine Primerdimerbildung auf. Die Bindungsregionen der einzelnen Primer und Sonden innerhalb des 5.8S rRNA-Gens sowie im ITS2-Bereich des ribosomalen Genclusters sind in Abbildung 14 schematisch verdeutlicht.





**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der Bindungsstellen der gruppen- und familienzuspezifischen Primer (—■), Sonden (—■) und des konservierten ITS4.2-Reversprimers (—■) innerhalb des ribosomalen Genclusters. Die Referenzsequenzen 1-17 entstammen der Nucleotid-Datenbank des NCBI mit folgenden Accession-Nummern: [1] JF729022, [2] AB353919, [3] EF136359, [4] AY944875, [5] JQ796883, [6] AY213684, [7] JX949174, [8] FJ478116, [9] AJ876525, [10] NR\_073243, [11] HM016883, [12] HQ340107, [13] HQ014696, [14] FJ878634, [15] AJ249484, [16] EU798700, [17] FM199972.

Der Einsatz dieser auf sieben Pilzzweige aufgeteilten Primer der „First Line“-fuPCR und der nachgeschalteten *Aspergillus*- und *Candida*-TaqMan-PCRs als „Second Line“-PCR konnte nun als klinische Screeningmethode für den Pilznachweis in Proben von immunsupprimierten, hämatologischen Patienten validiert werden (siehe Kapitel 3.6).

### 3.5 Design universeller Pan-Fungal-Primer

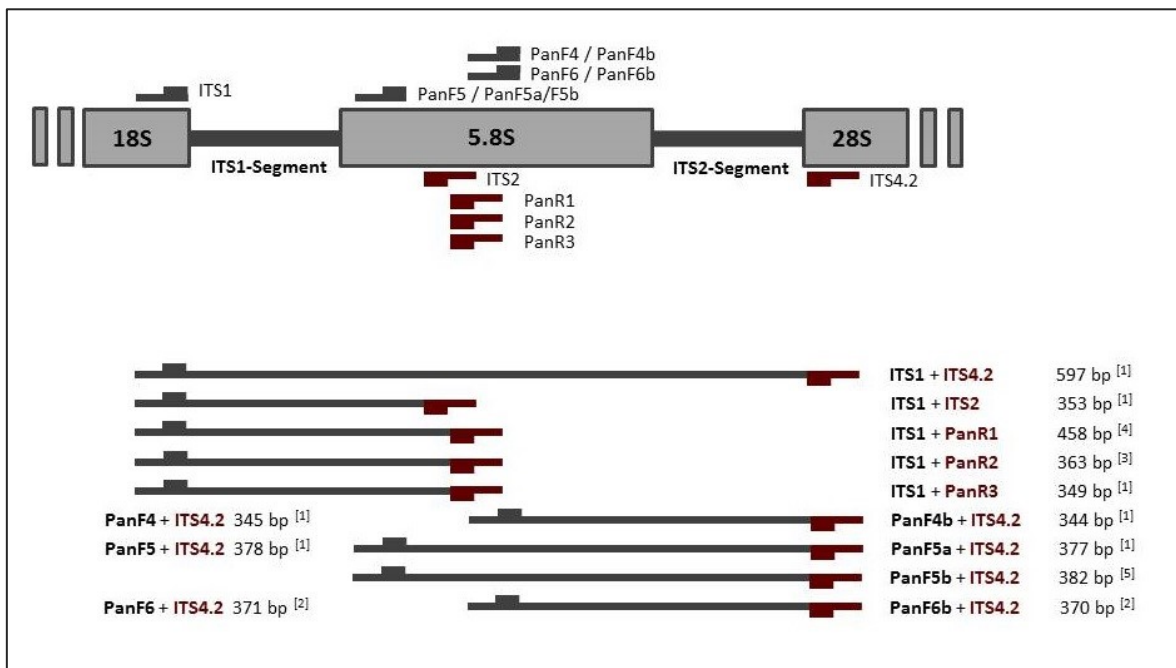
Neben den sieben familienspezifischen Reaktionen der fuPCR sollten universelle Pan-Primer für eine achte PCR-Reaktion entwickelt werden, um zwei Aufgaben zu erfüllen. Zum einen sollte diese PCR-Reaktion als Bestätigung dienen und ebenfalls positiv werden, wenn ein Pilz in einer der sieben zweigspezifischen Reaktionen detektiert wurde. Der zweite Aspekt der Pan-Fungal-Reaktion war ihre Konzipierung als Back-Up-PCR zur Amplifikation der DNA jedweder Pilzspezies. Sollten unbekannte und in der Ausgangsbetrachtung nicht berücksichtigte Pilze durch die familienspezifischen PCRs nicht erfasst werden, sollten diese in der universellen Pan-Reaktion detektiert werden.

Die PCR-Produkte der familienspezifischen PCR-Reaktionen (1-7) enthielten Größen von 132 bis 318 bp, die alle unter den identischen PCR-Bedingungen des fuPCR-Profiles in einem PCR-Lauf generiert wurden (siehe Kapitel 2.3.2.2). Das anfänglich verwendete Pan-Primerpaar ITS1-ITS4 führte zu PCR-Produkten von bis zu 627 Basenpaaren und war daher für den Einsatz als Pan-PCR im fuPCR-Panel aufgrund seiner Länge unter den etablierten Amplifikationsbedingungen nicht optimal geeignet. So sollten die neu zu generierenden Primer die Amplifikation kleinerer Fragmente und damit ein optimiertes Amplifikationsverhalten unter den fuPCR-Bedingungen ermöglichen; unter Beibehaltung ihrer universellen Bindungseigenschaften.

Basis für die Konzipierung von universellen Pan-Fungal-Primern waren die Sequenzdaten von 71 Pilzspezies aus 13 verschiedenen Genera (siehe Kapitel 1.1.3 sowie Kapitel 3.3). Alle verwendeten Sequenzdaten wurden entsprechend Kapitel 3.2 gesammelt und zur Erstellung von multiplen Sequenzalignments genutzt (siehe Kapitel 2.4.3). In den multiplen Sequenzalignments wurden konservierte Bindungsregionen für die Primer identifiziert. So konnten drei potentielle Regionen als Primerbindungsstellen für eine Pan-Pilz-PCR innerhalb des ribosomalen Genclusters definiert werden. Diese potentiellen Bindungsregionen befanden sich am 3'-Ende des 18S-rRNA-Gens, im 5'-Abschnitt der 5.8S-rDNA sowie im 5'-Bereich der 28S-rDNA (siehe Abbildung 15).

Mit der Software PrimerSelect (siehe Kapitel 3.4) wurden anschließend die Pan-Primer generiert. Die Primer unterschieden sich dabei in ihrer Bindungsposition und dem Bereich, den sie amplifizierten. Eine Übersicht aller erstellten Pan-Primer und ihre Kombination ist Abbildung 15 zu entnehmen. Die Sequenzen der Primer ITS1 und ITS2 wurden der Literatur entnommen [112]. Die Primer PanR1, PanR2, PanR3, PanF4, PanF5, PanF6, PanF4b, PanF5a, PanF5b und PanF6b wurden neu erstellt. Sowohl die Reaktionen mit den Primern ITS1 + ITS2 (Pan 2) als auch die Reaktionen mit den Primerkombinationen ITS1 + PanR1/PanR2/PanR3 (Pan 3) amplifizierten eine Region im ITS1-Element des ribosomalen Genclusters. Die Reaktion mit den Primerkombinationen PanF4/PanF5/PanF6 + ITS4.2 (Pan 4) und ihre weiterentwickelten Versionen PanF4b/PanF5a/PanF5b/PanF6b + ITS4.2 (Pan 5) generierten ein PCR-Produkt innerhalb des ITS2-Sequenzelementes. Die PCR mit der ursprünglichen Primerkombination ITS1 + ITS4.2 (Pan 1)

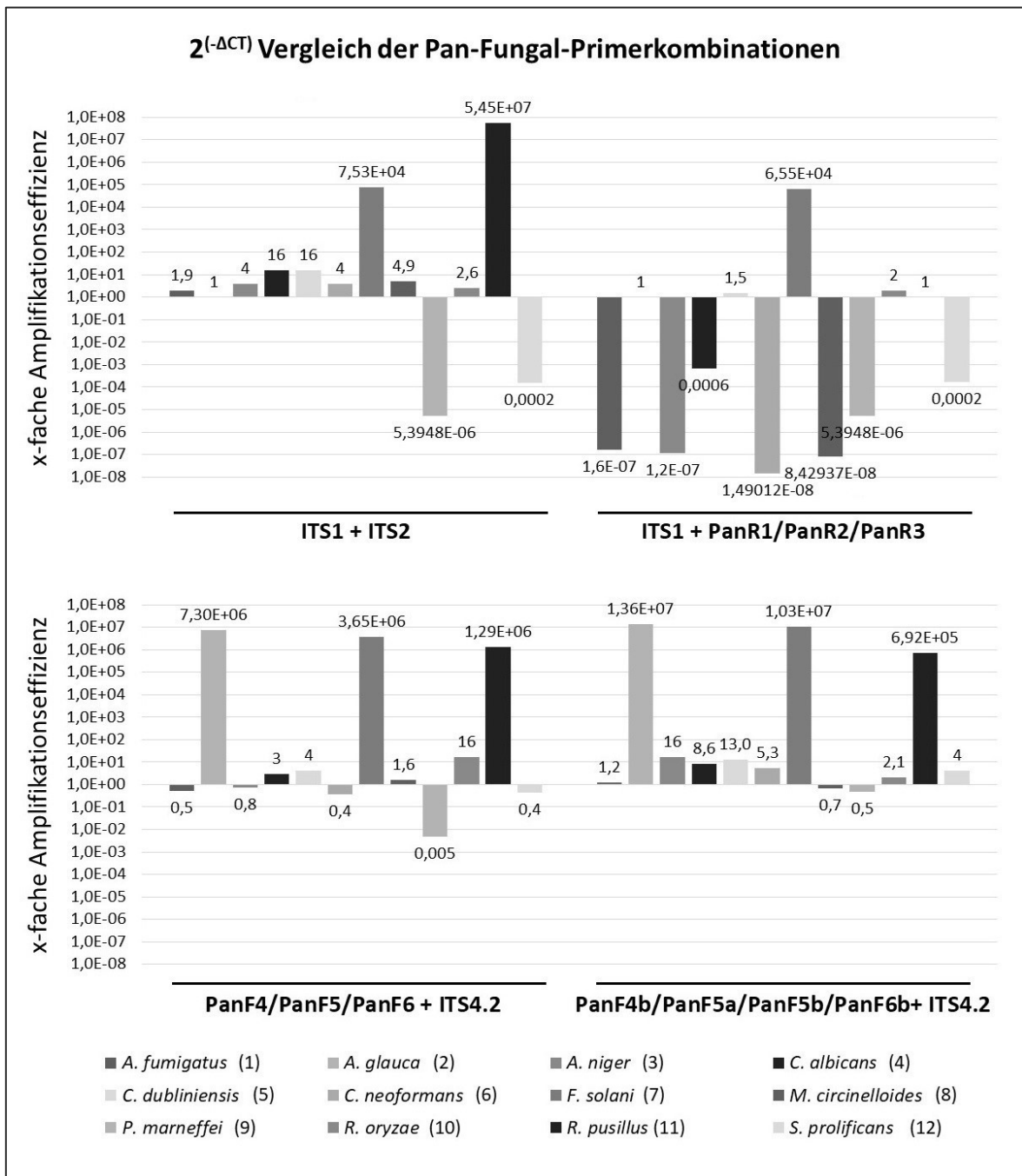
amplifiziert ein PCR-Produkt, in dem sowohl Bereiche des ITS1- als auch des ITS2-Elements enthalten sind (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Schematische Übersicht der Pan-Fungal-Primerbindestellen innerhalb des ribosomalen Genclusters. Die Referenzsequenzen sind den EC-Nummern der Nukleotid-Datenbank des NCBI zu entnehmen: [1] AY214446 [2] HQ285718 [3] EU798702 [4] AY944896 [5] JN942680.

Die universellen Pan-Fungal-Primer wurden in fünf verschiedenen Reaktionen kombiniert (Reaktionen Pan 1 – Pan 5) und in ihrer Effizienz miteinander verglichen. Genomische DNA von frisch kultivierten Pilzen diente dabei als Amplifikations-Matrize. Die qualitative Bewertung der PCR-Reaktionen und die Beurteilung, ob eine Reaktion als positiv für das Vorhandensein von Pilz-DNA beurteilt werden konnte, erfolgte anhand der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Kriterien. Pro PCR-Reaktion wurden 10ng DNA als Matrize unter dem in Kapitel 2.3.2.2 beschriebenen PCR-Profil eingesetzt. Jede Primerkombination wurde mit der DNA von zwölf verschiedenen Pilzspezies getestet.

Für den Vergleich der Pan-Primer wurde das ursprünglich verwendete Primerpaar ITS1 + ITS4.2 (Pan 1) in den Test mit aufgenommen und als Referenz gesetzt. In neun von zwölf Reaktionen konnte die DNA der getesteten Pilzspezies mit den Pan 1-Primern nachgewiesen werden. Lediglich die DNA von *R. pusillus*, *A. glauca* und *F. solani* konnte nicht von diesen Primern erkannt werden. Bereits nach 27,5 PCR-Zyklen (*A. glauca*) konnte kein charakteristisches Amplifikat mehr mit dieser Primerkombination festgestellt werden. Mit den Pan 1-Primern als Basisreferenz wurden die anderen vier ausgetesteten Pan-Fungal-Primerkombinationen anhand der  $2^{(-\Delta CT)}$ -Werte miteinander verglichen (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** 2<sup>(-ΔCT)</sup>-Vergleich der Pan-Primerkombinationen.

Durch die Pan 2-Primer (ITS1 + ITS2) wurden neun von zwölf Reaktionen als positiv bewertet, jedoch konnte die DNA von *S. prolificans*, *A. glauca* und *P. marneffeii* nicht detektiert werden. Im Gegensatz zur Pan 1-Kombination konnte in der Pan 2-PCR die DNA von *F. solani* und *R. pusillus* nachgewiesen werden. Für die anderen sieben übereinstimmenden Pilz-Nachweise (*A. fumigatus*, *A. niger*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. neoformans*, *M. circinelloides* und *R. oryzae*) war die Pan 2-Primerkombination in ihrer Leistung besser als die Pan 1-PCR (Faktor 1,9 bis 16; siehe Abbildung 16).



Die neue Pan 5-Primerkombination (PanF4b/PanF5a/PanF5b/PanF6b + ITS4.2) lieferte in der PCR nach der Anpassung auch das beste Ergebnis. Jede der zwölf Reaktionen konnte einen Nachweis für die Pilz-DNA liefern. Im Gegensatz zu den Pan 1-Primern konnte auch die DNA von *A. glauca*, *F. solani* und *R. pusillus* erfolgreich nachgewiesen werden. Lediglich zwei Reaktionen (*M. circinelloides* und *P. marneffeii*) waren in ihrem Amplifikationsverhalten den Pan 1-Primern unterlegen (Faktor 0,5 und 0,7). Im Gegenzug lieferten dafür jedoch sieben Reaktionen (*A. fumigatus*, *A. niger*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. neoformans*, *R. oryzae* und *S. prolificans*) bessere Ergebnisse als die Pan 1-Primer.

Da die Pan 5-Primer in der Lage waren, jede getestete Pilz-DNA zu amplifizieren, wurden sie als Pan-Fungal-Reaktion in das PCR-Set der fuPCR aufgenommen und zum Test von hämatologischen Materialien eingesetzt.

## **3.6 Untersuchung von klinischen Materialien hämatologischer Patienten und Kontrollen**

Um die fuPCR hinsichtlich ihrer Funktionalität und Aussagekraft zu testen, wurden klinische Proben aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie der Universitätsklinik Düsseldorf analysiert. Im Zuge der Dissertation wurden insgesamt 366 Proben (121 Rachenabstriche, 119 EDTA-Blutproben und 126 Blutseren) von immunsupprimierten Patienten untersucht.

### **3.6.1 Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs**

Die Proben wurden von 50 verschiedenen Patienten im Verlauf von Phasen der Neutropenie entnommen, von 31 männlichen (62 %) und 19 weiblichen (38 %) Patienten. Das Durchschnittsalter der männlichen Patienten belief sich auf 56,8 Jahre ( $\pm 11,9$ ). Bei den weiblichen Patienten lag das durchschnittliche Alter bei 55,1 Jahren ( $\pm 11,6$ ). Die Patienten wurden entsprechend der EORTC/MSG-Kriterien klassifiziert.

Im Zuge ihres Krankenhausaufenthaltes wurde den immunsupprimierten Patienten während routinemäßiger Untersuchungen einmal wöchentlich ein Probentriplet entnommen. Ein solches Probentriplet bestand jeweils aus einem Rachenabstrich sowie einer Probe EDTA-Blut und Blutserum. Die Probensammlung erfolgte von Mai 2014 bis Juni 2016. Während ihres Krankenhausaufenthaltes war der Immunstatus aller beteiligten Patienten hochgradig immunsupprimiert, entweder durch die hämatologischen Grunderkrankungen oder bedingt durch die immunsuppressive Therapie (Tabelle 24). Die vorherrschenden Krankheitsbilder waren akute myeloische Leukämien (AML) bei 22 Patienten (44 %) und multiple Myelome (MM) bei 8 Patienten (16 %). Die restlichen 20 Patienten (40 %) wiesen andere hämatologische und onkologische Krankheitsbilder auf (siehe Tabelle 24).

**Tabelle 24:** Klinische Charakteristiken der Patienten- und Kontrollgruppe im Zuge der Probenentnahme

<b>Charakteristika</b>	<b>Gesamt</b>	<b>Mit positiver Blutprobe</b>
<b>Patienten</b>		
Anzahl von Patienten	50	14
Alter, Median (Spektrum) in Jahren	56,8 (25-82)	57,9 (33-75)
Geschlecht n (%)		
Männlich	31 (62 %)	8 (58 %)
Weiblich	19 (38 %)	6 (43 %)
Krankheit n (%)		
AML	22 (44 %)	7 (50 %)
MDS RAEB 2	4 (8 %)	3 (21 %)
ALL	3 (6 %)	1 (7 %)
Multiples Myelom (MM)	8 (16 %)	2 (14 %)
NHL	4 (8 %)	0
Progressive CMML	2 (4 %)	0
CLL	1 (2 %)	1 (7 %)
Myeloproliferative Krankheit	3 (6 %)	0
Hodenkarzinom	2 (4 %)	0
Liposarkom	1 (2 %)	0
Therapiestatus während der Probenentnahme (%)		
1st Induktion	16 (32 %)	4 (29 %)
1st Konsolidation	7 (14 %)	0
Autologe Stammzelltransplantation	10 (20 %)	1 (7 %)
Allogene Stammzelltransplantation	11 (22 %)	8 (57 %)
Salvage-Chemotherapie nach Rückfall	6 (12 %)	1 (7 %)
Mit immunsuppressiver Therapie (%)	11 (22 %)	8 (57 %)
Vorher existierende Pneumonie n (%)		
Dokumentiert	13 (26 %)	3 (21 %)
Anzahl dokumentierter Pneumonien	37 (74 %)	11 (79 %)
CT-Thorax auffällig für fungale Pneumonie n (%)	9 (18 %)	5 (36 %)
<b>Kontrollgruppe</b>		
Anzahl an Individuen	30	
Alter, Median (Spektrum) in Jahren	35,1 (25,9-44,3)	
Geschlecht n (%)		
Männlich	11 (36,7 %)	
Weiblich	19 (63,3 %)	



Parallel zu den 50 immunsupprimierten Patienten wurde zusätzlich ein Kollektiv von 30 gesunden Individuen mit je 3 Proben (Rachenabstrich, EDTA-Blut und Blutserum) in den Studienverlauf als Kontrollgruppe mit aufgenommen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme wurde bei ihnen keine Erkrankung festgestellt und die Probanden wiesen einen immunkompetenten Status auf. Unter den 30 immunkompetenten Individuen befanden sich 11 Männer (36,7 %) mit einem durchschnittlichen Alter von 31,5 Jahren ( $\pm 6$ ) und 19 Frauen (63,3 %) mit einem Durchschnittsalter von 35,1 Jahren ( $\pm 9,2$ ).

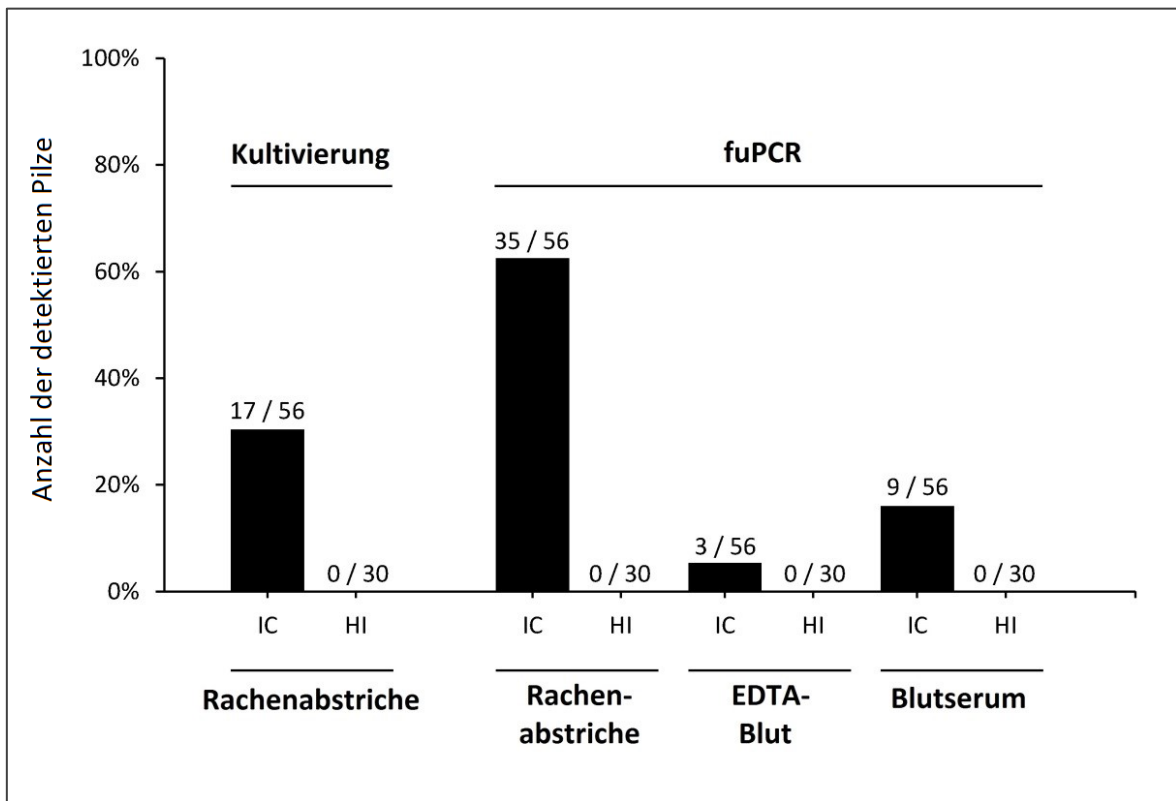
### 3.6.2 Detektion von pathogenen Pilzen in klinischen Proben

Alle klinischen Proben wurden in der fuPCR analysiert; anfänglich ohne einen kulturellen Nachweis von Pilzen, später dann mit einer simultanen Kultivierung der Pilze aus den Rachenabstrichen.

Im ersten Schritt wurden 198 Proben (65 Rachenabstriche, 63 EDTA-Blutproben und 70 Blutseren) von immunsupprimierten Patienten mittels fuPCR analysiert. Alle PCR-Produkte wurden sequenziert und die Pilzspezies mittels Datenbankabgleich ermittelt. 50,8 % (33/65) der respiratorischen Proben (Rachenabstriche) wurden positiv in einer der fuPCR-Reaktionen. Eine Probe wurde mittels TaqMan-PCR und Sondenmarkierung sogar positiv für die DNA von zwei verschiedenen Pilzen getestet. 4,8 % (3/63) der EDTA-Blutproben und 1,4 % (1/70) der Blutseren wurden ebenfalls positiv für Pilz-DNA der Genera *Candida*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* und *Malazessia* getestet.

Im Folgenden wurden 56 Rachenabstriche von immunsupprimierten Patienten sowohl mittels fuPCR-Assay als auch durch eine parallele Kultivierung der respiratorischen Proben untersucht. Dieser simultane Ansatz diente zur Analyse der Sensitivität und Vergleichbarkeit von PCR und Kultivierung. Die korrespondierenden 56 Blutproben (EDTA-Blut und Blutserum) wurden nur mittels fuPCR analysiert.

Durch beide Methoden übereinstimmend – mittels fuPCR und Kultivierung von Pilzen – wurden 30,4 % (17/56) der Rachenabstriche positiv und 37,5 % (21/56) negativ bewertet. 32,1 % (18/56) der Rachenabstriche wurden hingegen fuPCR-positiv mit einem negativen kulturellen Ansatz getestet, was auf einen niedrigeren Grad an Sensitivität der Kultivierung im Vergleich zum fuPCR-Assay hinwies (siehe Abbildung 18 sowie Tabelle 25).



**Abbildung 18:** Durch fuPCR-Assay und Kultivierung detektierter prozentualer Anteil an Pilzen in Rachenabstrichen, EDTA-Blut und Blutseren von immunsupprimierten Patienten (IC) und gesunden Probanden (HI). Die absolute Anzahl an detektierten Pilzen im Verhältnis zur Anzahl an getesteten Proben ist über den Säulen dargestellt.

Um die Relevanz der identifizierten Pilze in Relation zum Status der Immunsuppression zu evaluieren, wurden entsprechende Probensets (EDTA-Blut, Blutserum und Rachenabstriche) von 30 gesunden Individuen als Kontrollgruppe mittels fuPCR untersucht. Die Probanden zeigten zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine Anzeichen einer Immunsuppression und alle Rachenabstriche wurden zudem parallel durch einen kulturellen Ansatz getestet (siehe Abbildung 18). Alle Proben dieser Kontrollgruppe wurden sowohl durch fuPCR als auch den kulturellen Ansatz negativ getestet.

Für die 17 übereinstimmenden Testergebnisse (positiv durch fuPCR und Standardkultivierung) stimmten die durch beide Methoden nachgewiesenen Pilzspezies zu 100 % überein (siehe auch Tabelle 25).

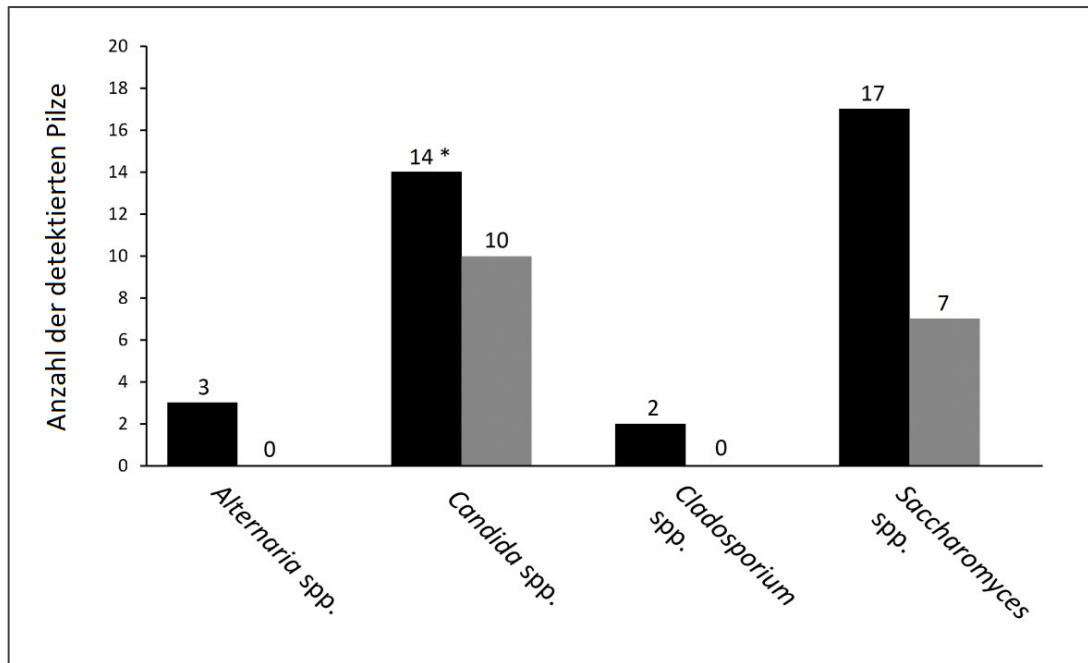
**Tabelle 25:** Ergebnisse der fuPCR und Standardkultivierung

Anzahl der Probensets <sup>(a)</sup>	Kultur Rachenabstrich	PCR		
		Rachenabstrich	EDTA-Blut	Blutserum
17 <sup>(10)</sup>	-	-	-	-
8 <sup>(7)</sup>	-	<i>S. cerevisiae</i>	-	-
5 <sup>(5)</sup>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-
5 <sup>(5)</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	-	-
2 <sup>(1)</sup>	-	<i>C. dubliniensis</i>	-	-
2 <sup>(2)</sup>	-	-	<i>Cladosporium spp.</i>	-
1	<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	-	<i>Fusarium spp.</i>
1	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	-	-
1	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	-	<i>E. nigrum</i>
1	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	-
1	<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. zeylanoides</i>	-	-
1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Pleosporales spp.</i>	-
1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	-	<i>Cladosporium spp.</i>
1	-	<i>Cladosporium spp.</i>	-	-
1	-	<i>Saccharomyces spp.</i>	-	-
1	-	<i>Alternaria alternata</i>	-	-
1	-	<i>Alternaria spp.</i>	-	-
1	-	-	-	<i>M. restricta</i>
1	-	<i>S. cerevisiae</i>	-	<i>C. guilliermondii</i>
1	-	-	-	<i>Cladosporium spp.</i>
1	-	<i>Alternaria spp.</i>	-	<i>Cladosporium spp.</i>
1	-	<i>Pichia spp.</i>	-	<i>C. tropicalis</i>
1	-	<i>Cladosporium spp.</i>	-	<i>Fusarium spp.</i>

Negative PCR und Kultivierungsergebnisse werden mit „-“ dargestellt. <sup>(a)</sup> Anzahl der Patienten innerhalb der entsprechenden Probenmenge.

Darüber hinaus war die fuPCR für 5,4 % (3/56) aller EDTA-Blutproben und 16,1 % (9/56) der Blutseren positiv. Bemerkenswerterweise waren acht Probensets im Rachenabstrich und eine der klinischen Blutproben, entweder EDTA-Blut oder Blutserum, fuPCR-positiv. Es zeigten sich jedoch keine Übereinstimmungen in Bezug auf die Identität der detektierten Pilzspezies (siehe auch Tabelle 25).

In den Rachenabstrichen der immunsupprimierten Patienten wurden durch den fuPCR-Assay insgesamt 36 Pilze gefunden, welche zu vier unterschiedlichen Pilzgattungen gezählt werden (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Nachgewiesene Pilze durch fuPCR (schwarze Säulen) und Kultivierung (graue Säulen) in 56 Rachenabstrichen von immunsupprimierten Patienten. \* In einer Probe wurden zwei unterschiedliche Pilzspezies gefunden.

38,9 % (14/36) der Pilze gehören zu *Candida* spp., 47,2 % (17/36) zu *Saccharomyces* spp., 8,3 % (3/36) zu *Alternaria* spp. und 5,6 % (2/36) zu *Cladosporium* spp. Im parallel durchgeführten kulturellen Ansatz wurden insgesamt nur 17 Pilze der *Candida* spp. (10/17) und *Saccharomyces* spp. (7/17) gefunden.

Parallel zu den zweig- und familienspezifischen Primer-Sets (Reaktionen A - F) wurden die Pan-Fungal-Primer in der Kombination PanF4b/F5a/F5b/F6b + ITS4.2 zur Untersuchung der klinischen Proben eingesetzt. In zehn Proben (2,73 %; 10/366) wurde DNA von Pilzen sowohl in der Pan-Fungal-PCR als auch durch die zweig- und familienspezifischen PCRs nachgewiesen. Ebenfalls übereinstimmend bei beiden Testsets wurden 284 Proben (77,05 %; 282/366) als negativ für Pilz-DNA getestet. Hingegen wurden 73 Proben durch die Pan-Fungal-Primer als negativ getestet, enthielten jedoch nach Analyse in den zweig- und familienspezifischen-PCRs Pilz-DNA (19,95 %; 73/366). In einer Probe lieferte die Pan-Fungal-PCR ein positives Ergebnis für die DNA von Pilzen, wohingegen die zweig- und familienspezifischen-PCRs nicht in der Lage waren, einen Pilznachweis zu erbringen (0,27 %; 1/366). Wurden pathogene Keime durch beide Testsets in den klinischen Proben festgestellt, war die Bestimmung der genauen Pilzspezies übereinstimmend, sowohl durch die Pan-Fungal-Primer als auch durch die zweig- und familienspezifischen Primer.

Retrospektiv wurden klinische Untersuchungsdaten im Zuge der Routinediagnostik gesammelt. Für 36 von 50 (72 %) Patienten waren validierte Blutkulturen für die Identifizierung von *Candida*- und *Cryptococcus*-Spezies durchgeführt worden, welche jedoch kein Pilzwachstum zeigten. Die mittels fuPCR analysierten Blutproben (EDTA-Blut und Blutserum) dieser Patienten wurden ebenfalls negativ auf Pilz-DNA getestet.

### **3.6.3 Korrelation der PCR-Ergebnisse mit klinischen Untersuchungsdaten**

Um die klinische Relevanz der fuPCR-Resultate zu evaluieren, wurden alle positiven Pilznachweise mit den klinischen Untersuchungsdaten aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie korreliert. Jeder Studienpatient befand sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme in einem Zustand der Immunsuppression und wies daher ein erhöhtes Risiko für eine Pilzinfektion auf. Die Patienten wurden im Durchschnitt 2,4-mal klinisch getestet, wobei der durchschnittliche Zeitraum zwischen den Probenentnahmen 6,7 Tage betrug.

Von den 50 immunsupprimierten Patienten wiesen zehn Patienten eine nach EORTC/MSG-Kriterien mögliche fungale Pneumonie auf (EORTC/MSG: „possible“ [21]). Die Diagnose wurde im Verlauf der Beobachtungszeit aufgrund von typischen Anzeichen während der hochauflösenden Computertomographie (HR-CT) gestellt. Von diesen zehn Patienten wurden für acht Patienten positive fuPCR-Ergebnisse erhalten, entweder aus Blutproben (n = 6; EDTA-Blut und Blutserum), Rachenabstrichen (n = 12) oder aber beiden Probenarten (n=5) (siehe Tabelle 26).

**Tabelle 26:** Zeitliche Korrelation von PCR-positiv getesteten klinischen Proben mit Pneumonie-positiv beurteilten HR-CT-Thorax-Aufnahmen von Patienten

Patient	2014												2015			
	Jan	Feb	Mär	Apr	Mai	Juni	Juli	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jan	Feb	Mär	Apr
#01							+									
#02																
#03																
#04																
#05																
#06																
#07																
#08																
#09																
#10																

■ : CT-diagnostizierte Pneumonie; □ : CT unauffällig; +: PCR-positiv getestetes Material (A, Rachenabstrich; E, EDTA-Blut; S, Blutserum).

Zwei Patienten mit einer durch HR-CT-Aufnahmen anzunehmenden fungalen Pneumonie wurden in allen drei klinischen Materialien fuPCR negativ getestet (Patienten #02 und #04). Fünf der zehn Patienten mit möglicher fungaler Pneumonie wiesen positive fuPCR-Ergebnisse zum Zeitpunkt der HR-CT-Aufnahmen und der klinischen Diagnosestellung einer Pneumonie auf (Patienten #01, #03, #07, #09 und #10). Bei einem Patienten konnte eine fuPCR-positive Probe zwei Monate vor dem klinischen Befund festgestellt werden (Patient #05), wohingegen bei zwei anderen Patienten ein fuPCR-positives Ergebnis erst zwei bzw. drei Monate nach den CT-Aufnahmen gezeigt werden konnte (Patient #08 bzw. #06).

Rachenabstriche repräsentierten das klinische Probenmaterial mit den höchsten Pilznachweisen. Von den insgesamt 50 Patienten wurden 31 in mindestens einem Rachenabstrich fuPCR-positiv getestet. Acht der 31 in Rachenabstrichen Pilz-positiv getesteten Patienten (25,8 %) wiesen entsprechend der EORTC/MSG-Kriterien eine mögliche fungale Pneumonie auf („possible“ fungal pneumonia). Alle anderen Patienten zeigten keine klinischen Anzeichen einer Pneumonie (74,2 %).

In Bezug auf die analysierten Blutproben wurden 14 der 50 immunsupprimierten Patienten entweder in EDTA-Blut oder in Blutserum mittels PCR positiv getestet. Bei einer Korrelation der fuPCR-Ergebnisse mit dem klinischen Status der Patienten wurde offensichtlich, dass fünf von 14 Patienten (35,7 %) mit positiv getesteten Blutproben eine gemäß der EORTC/MSG-Kriterien mögliche fungale Pneumonie („possible“ fungal pneumonia) während des Beobachtungszeitraumes aufwiesen. Des Weiteren zeigten drei der 14 Patienten (21,4 %)

klinische Anzeichen einer Pneumonie, erfüllten jedoch nicht alle EORTC/MSG-Kriterien für eine mögliche fungale Pneumonie aufgrund fehlender CT-Aufnahmen. Sechs der 14 untersuchten hämatologischen Patienten waren klinisch unauffällig.

Fünf verschiedene Pilzspezies wurden in den Blutproben der acht Patienten gefunden (fünf „EORTC possible for fungal infection“ sowie drei Patienten ohne vollständige Erfüllung der Kriterien). Die EDTA-Blutproben wurden positiv getestet auf *Cladosporium* und *Pleosporales* spp. In den Blutserum-Proben wurden *Malassezia restricta*, *Epicoccum nigrum* sowie *Microdochium* (*Fusarium*) und *Cladosporium* spp. gefunden.

Alle 14 Patienten mit analysierten Blutproben, die letztlich positiv auf Pilz-DNA getestet wurden, litten unter hämatologischen Erkrankungen. Sieben hatten eine akute myeloische Leukämie (AML), drei ein myelodysplastisches Syndrom (MDS), zwei ein Multiples Myelom (MM), eine Patientin eine chronische lymphatische Leukämie (CLL) und ein Patient eine akute lymphatische Leukämie (ALL). Mehr als die Hälfte von ihnen (8/14; 57 %) wurde während des Zeitfensters der Probenentnahme einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen.

## 4 DISKUSSION

Invasive Pilzinfektionen stellen eine ernst zu nehmende Gefahr für eine stetig wachsende Population an immunsupprimierten Individuen sowie Hochrisikopatienten dar und verlaufen unbehandelt meist tödlich [4, 86]. Der frühe Beginn einer medizinischen Behandlung und die Möglichkeiten, die antimykotische Therapie an die vorliegenden Keime anzupassen, können den Behandlungsausgang und die Überlebenschancen der betroffenen Patienten signifikant verbessern [161]. Die Erkennung und differentielle Diagnose von invasiven Pilzinfektionen verbleibt daher eine herausfordernde Aufgabe für die Medizin und muss dringend verbessert werden. Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Konzipierung und Entwicklung einer PCR-basierten Methode zur Detektion von klinisch relevanten Pilzspezies für Patienten mit hämatologischen oder onkologischen Grunderkrankungen.

Die neuartige fuPCR wurde dahingehend entwickelt, jedwedes Material als DNA-Quelle zu verwenden. So können beispielsweise Biopsien (Lunge, ZNS), respiratorische Proben (BAL, Sputum, Rachenabstrich), Blutproben (EDTA-Blut, Blutserum, Plasma) oder kultivierte Pilze zur DNA-Isolation (siehe Kapitel 2.3.1) und anschließenden fuPCR-Analyse eingesetzt werden. Im Rahmen der Studie zum Test der fuPCR an Patientenmaterialien wurden aufgrund von klinischen Aspekten nicht invasiv gewonnenes respiratorisches Material (Rachenabstriche) sowie durch Blutabnahme gewinnbare Proben (EDTA-Blut und Blutserum) verwendet. Obwohl die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) den Goldstandard unter den klinischen Probenmaterialien für die Detektion von Pneumonie verursachenden, pathogenen Keimen repräsentiert [4, 6, 49], wurden im Rahmen dieser Studie Rachenabstriche als ein einfach zu gewinnendes respiratorisches Material des oberen respiratorischen Traktes eingesetzt. Prozeduren zur Entnahme einer BAL tragen aufgrund des geschwächten Vitalstatus von hämatologischen Patienten das potentielle Risiko von unkontrollierten Blutungen in sich und wurden daher in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie nur extrem restriktiv durchgeführt. Bei Konzeption der Studie und Diskussion der zu gewinnenden Probenmaterialien wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich bei Patienten mit fungaler Pneumonie die verursachenden Pilze nicht ausschließlich in der Lunge befinden, sondern auch im gesamten respiratorischen Trakt nachweisbar sind. Die Eignung des Rachenabstrichs als respiratorische Probe, die als Untersuchungsmaterial für den kulturellen Pilznachweis im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene schon akkreditiert worden war, konnte durch die fuPCR-Ergebnisse von 28 Patienten mit bestätigter Pneumonie bestätigt werden (siehe Kapitel 3.6).

In der mikrobiologischen Diagnostik besitzen Blutkulturen zum Nachweis von Sprosspilzinfektionen einen hohen Stellenwert [4, 6]. Auch in der PCR-basierten Diagnose von *Candida*- [162] und *Aspergillus*-Infektionen [113, 163, 164] wurden Vollblut-, Serum- und



Plasmaproben schon auf breiter Basis verwendet. Anders als die Entnahme einer BAL stellt Vollblut ein einfach zu gewinnendes klinisches Probenmaterial dar, ohne die Vitalfunktionen des Patienten negativ zu beeinflussen. Daher wurden sowohl EDTA-Blut als auch Blutserum neben dem Rachenabstrich als Untersuchungsmaterial für die fuPCR aufgenommen und hinsichtlich ihrer Eigenschaft evaluiert, als klinische Proben für eine diagnostische Pilz-Screening-PCR zu dienen.

#### 4.1 Vorteile der neu entwickelten fuPCR gegenüber publizierten PCR-Methoden

In den vergangenen 20 Jahren wurde eine große Anzahl an verschiedenen molekularbiologischen Methoden für die Identifikation von Pilzspezies publiziert, die sich unterschiedliche Formen von PCR-Techniken zunutze machen. Keine dieser PCR-Methoden war jedoch in ihrer bisher etablierten Version für die Detektion des Spektrums an Pilzen in klinischen Proben von hämatologischen Patienten umfassend genug, um alle relevanten Pilzpathogene detektieren zu können [106, 112, 165].

Aktuell sind die meisten molekularbiologischen Diagnostikverfahren darauf fokussiert, einen einzigen Pilzgenus zu detektieren [106-108, 166], oder sie zielen lediglich auf ein außerordentlich begrenztes Spektrum an Pilzspezies ab [111, 112]. Die Wahl des verwendeten klinischen Untersuchungsmaterials für eine Analyse unterschied sich ebenfalls in den Studien. Die meisten Realtime-PCR-Assays, welche den ITS1- und ITS2-Sequenzabschnitt des ribosomalen Genclusters als Zielgen wählten [112, 167, 168], wurden dahingehend entwickelt, entweder Vollblut oder BAL als klinisches Material zu verwenden. In diesem Fall umfasste ihr analytisches Spektrum meist die weitverbreiteten pathogenen Pilze *Aspergillus* und *Candida* [112]. So wurde für den PCR-basierten Nachweis von *Aspergillus*-Pneumonien oftmals klinisches Material, welches aus der Lunge gewonnen wurde, benutzt und die bronchoalveoläre Lavage (BAL) stellte hierbei eines der geeignetsten klinischen Materialien dar [105, 169, 170]. Im Kontrast dazu stellt *Candida* die vorherrschende, durch Pilze verursachte Blutbahninfektion dar. Publierte PCR-Diagnostikmethoden fokussieren sich daher für ein *Candida*-orientiertes Keimspektrum in erster Linie auf die Verwendung von Vollblut [171-173]. Dies lässt erkennen, dass diese Diagnostikverfahren darauf konzentriert waren, einen speziellen Keim in einem für sein Krankheitsbild typischen, klinischen Material nachzuweisen, und nicht das Ziel verfolgten, eine umfassende und universelle Pilz-Diagnostik zu erschaffen.

PCR-Methoden für ein erweitertes Detektionsspektrum an Pilz-Spezies und -Gattungen sind bis zum heutigen Zeitpunkt nur in begrenztem Maße verfügbar. Massire et al. publizierten ein Verfahren, in dem eine konventionelle PCR mit Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie kombiniert wurde, um Pilze aus den Unterabteilungen der Mucoromycotina, Basidiomycota,

Ascomycota und Saccharomycetes auf der Genus- und Speziesebene zu identifizieren [104]. Obwohl diese Methode eine hohe Detektionsrate für *Aspergillus*- und *Candida*-Spezies aufwies, war ein bedeutender Nachteil des Assays die Notwendigkeit, kulturell angezüchtete Pilze als Probenmaterial zu verwenden. Dieser zeitaufwendige Schritt der Anzucht benötigte mehrere Tage und verhinderte damit die direkte Nutzung von klinischen Proben.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte fuPCR besitzt den Vorteil, dass sie universell mit isolierter DNA aus einem beliebigen Material eingesetzt werden kann. Im Zuge der durchgeführten Patientenstudie wurde die fuPCR zwar konkret mit EDTA-Blut, Blutserum und Rachenabstrichen als DNA-Quelle getestet, jedoch kann das zugrunde liegende Patientenmaterial in zukünftigen Studien angepasst und um weitere Proben wie beispielsweise Rachenspüllösung erweitert werden. Da klinische Proben direkt zur Isolation von DNA verwendet werden können, ist eine vorausgehende Kultivierung der Pilze für eine exakte Identifizierung mittels fuPCR überflüssig. Obwohl die Identifizierung der infizierenden Pilzspezies erst nach einer Sangersequenzierung des fuPCR-Produktes erfolgt, liefert die Analyse der positiven fuPCR-Reaktionen (A - G) direkt im Anschluss des PCR-Laufes bereits einen ersten Hinweis auf die im klinischen Material vorhandene Pilzgruppe (siehe Kapitel 3.3). Diese Information kann aus diagnostischer Sicht bereits sehr hilfreich sein, um eine antimykotische Therapie frühzeitig zu beginnen oder auf die jeweilige Pilzfamilie einzugrenzen. So wird im Zuge einer Primärtherapie bei Hochrisikopatienten mit invasiven Aspergillosen bereits ein direkter Einsatz von liposomalen Amphotericin B oder Voriconazol empfohlen. Eine weiterführende Zweitlinien-Therapie wird mit Caspofungin oder Posaconazol realisiert [174]. Sollte hingegen eine Infektion mit *Fusarium* diagnostiziert werden, muss aufgrund der schwachen Wirksamkeit von Amphotericin B eine sofortige Therapie mit Voriconazol und Posaconazol durchgeführt werden [175]. Die Auswahl des adäquaten Antimykotikums bzw. der gezielte Ausschluss eines Medikaments können somit direkt nach Auswertung der PCR-Daten erfolgen.

Ein essentielles Merkmal der fuPCR ist die simultane Detektion von mehr als einer in den klinischen Proben vorhandenen Pilzspezies. Dies eröffnet die Möglichkeit, bei Patienten eine potentielle Co-Infektion mit diversen Pilzen innerhalb eines einzigen PCR-Laufes frühzeitig zu erkennen. Obwohl Infektionen von *Aspergillus* mit weiteren Pilzspezies nur selten in der Literatur beschrieben werden [176], basiert diese spärliche Berichterstattung womöglich auf ungebräuchlichen oder unzureichenden diagnostischen Verfahren. Co-Infektionen wird eine große klinische Bedeutung zugesprochen, da eine zeitgleiche Infektion mit mehreren opportunistischen Pilzspezies einen außerordentlich negativen Effekt auf den Krankheits- und Behandlungsverlauf des betroffenen Patienten hat [177-179]. In einer von Lass-Florl et al. vorgestellten Studie konnte erfolgreich eine polymikrobielle Mixtur detektiert werden, bei der mit einer universellen Pan-Fungal-PCR ein Abschnitt der ITS2-Region amplifiziert wurde. Jedoch erfolgte dort keine weiterführende Differenzierung auf Genus- oder Spezies-Ebene [180].

## 4.2 Test der fuPCR mit klinischen Proben hämatologischer Patienten

Die klinische Ausbildung von invasiven Pilzinfektionen fällt in Abhängigkeit der involvierten Pilzspezies unterschiedlich aus (siehe Kapitel 1.1.3). Ausgehend von der Literaturlage war anzunehmen, in den unterschiedlichen klinischen Probearten (Rachenabstriche im Vergleich zu EDTA-Blut und Blutserum) ebenfalls unterschiedlich vorherrschende Pilzgattungen zu detektieren.

Hefepilze der Gattung *Candida* sind als kommensalische Organismen ein natürlicher Bestandteil des gastrointestinalen Traktes von gesunden Menschen [181], stellen jedoch zeitgleich die bedeutendsten Verursacher von Blutstrominfektionen durch Pilze dar [6]. Durch die fuPCR sollten daher Spuren von *Candida*-DNA sowohl in respiratorischen Materialien als auch in Blutproben nachgewiesen werden. Übereinstimmend waren die am häufigsten nachgewiesene Pilzspezies der vorliegenden Studie *Candida* spp. in Rachenabstrichen, was eine deutliche Dominanz von Hefepilzen in den getesteten klinischen Proben zeigt (siehe Abbildung 19, Kapitel 3.6.2).

Obwohl *Candida* für die mit Abstand größte Anzahl an Pilzinfektionen in immunsupprimierten Patienten verantwortlich gemacht wird [182, 183], werden diese Pilze nur selten als Verursacher von Pilz-Pneumonien beschrieben. Pneumonien stellen jedoch die bedeutendste und gefährlichste Form der Pilzinfektion in immunsupprimierten Patienten dar [6, 184]. Die meisten Fälle einer invasiven Candidiasis wurden der Infektion des Blutkreislaufes zugeschrieben [182, 185]. In Patienten mit verschiedenen Arten von hämatologischen Erkrankungen waren bemerkenswerterweise 100 % der aus Blut isolierten *Candida*-Spezies mit einer Sepsis assoziiert [186]. Der Hauptteil der im Rahmen dieser Studie durch die fuPCR detektierten *Candida*-Arten in respiratorischen Materialien repräsentieren demzufolge sehr wahrscheinlich in erster Linie kolonisierende Arten. Jedoch stellen diese Pilze für immunsupprimierte Patienten eine potentielle Infektionsquelle dar und sollten daher im Rahmen einer antimykotischen Therapie berücksichtigt werden. Diese These wird durch Befunde gestützt, dass sich eine pulmonale Kolonisation mit *Candida* spp. als Voraussetzung für die Ausprägung einer nachfolgenden Sepsis zeigte [187, 188]. Dementsprechend kann die frühe Identifizierung von kolonisierenden *Candida* spp. (mittels fuPCR) letztlich dabei helfen, die Ausbildung einer Infektion bei Hochrisikopatienten zu verhindern.

Ein signifikanter Prozentsatz an pulmonalen Infektionen wird nach Berichten der Forschungsgruppe von Barnes et al. durch *Aspergillus* spp. (26 %) verursacht [189]. Molekulare Methoden für den Nachweis von *Aspergillus* spp. in respiratorischen Proben sind aus diesem Grund bereits auf breiter Basis verfügbar [112, 190]. Aus diesem Grund war zu erwarten, in den Rachenabstrichen Spuren von *Aspergillus*-DNA zu detektieren. Darüber hinaus sollte evaluiert werden, ob auch ein Nachweis von *Aspergillus* in den Blutproben (EDTA-Blut und Blutserum) zu erzielen wäre. Im Fall einer pulmonalen Aspergillose zeigen Gefäße in der Lunge deutliche

Anzeichen eines Eindringens von Pilzhyphe[n] [191]. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass in Geweben von neutropenischen Patienten, die unter einer invasiven pulmonalen Aspergillose litten, eine Angioinvasion (Eindringen in Blutgefäße oder Lymphgefäße) zu Blutungen führt [192]. Da die Pilze im Verlauf des Infektionsprozesses die Schranke in den Blutkreislauf des Menschen überschreiten, sollte es somit auch möglich sein, ihre DNA in den Blutproben nachzuweisen.

*Aspergillus*-DNA von Referenzstämmen konnte erfolgreich in Experimenten mittels fuPCR nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.1.7.1 und 3.4.3), sowohl durch die „First Line“-fuPCR als auch durch die modifizierten, speziesspezifischen „Second Line“-TaqMan-PCRs. In den analysierten respiratorischen Materialien und Blutproben der hämatologischen Patienten konnte jedoch keine DNA von *Aspergillus*-Spezies nachgewiesen werden. Dies war nicht unbedingt verwunderlich, da nach Arbeiten von Hopfer et al. Patienten, die sogar an einer invasiven Aspergillose litten, durchaus auch negative Blutkulturen aufwiesen [193]. Selbst in Tiermodellen für *Aspergillus*-Infektionen wiesen bis zu 75 % der infizierten Mäuse und Kaninchen *Aspergillus*-negative Blutproben auf [194], was eine allgemeine Schwierigkeit bei der Detektion von *Aspergillus* spp. in Vollblutproben nahelegt. Studien mit einem Fokus auf Kultivierungsmethoden berichteten zudem, dass die Kultivierung von *Aspergillus* spp. und anderen Schimmelpilzen aus Autopsiegeweben und Biopsien generell sehr langer Inkubationszeiten bedarf [195, 196]. PCR-basierte Methoden für die Diagnose von *Aspergillus* spp. aus respiratorischen Materialien verwendeten mit BAL, Sputum oder Bronchialsekreten überwiegend Proben aus dem unteren Respirationstrakt als klinische Probenquelle [105, 197-199]. Bei Verwendung von BAL konnte dabei mit bis zu 69 % die höchste Detektionsrate erzielt werden. Obwohl für die fuPCR eine hohe Sensitivität bei Testung von Pilz-DNA gezeigt werden konnte, repräsentieren Blut und Rachenabstriche möglicherweise nicht die idealen Probenmaterialien für die Diagnose von *Aspergillus*-Spezies. Daher sollte in zukünftigen Arbeiten ein Vergleich von BAL und Rachenabstrichen als klinischem Probenmaterial erfolgen. Hierbei bleibt jedoch zu beachten, dass die Entnahme einer BAL bei hämatologischen Patienten nur dann durchgeführt werden kann, wenn sie klinisch vertretbar ist. Neben BAL als klinischem Probenmaterial gibt es eine zunehmende Zahl an Publikationen, die sich auf Plasma als klinisches Material zum Nachweis von *Aspergillus*-DNA fokussieren. Ältere Berichte attestierten PCR-Assays, die Plasma als Quelle für die DNA-Isolation verwendeten, jedoch schlechtere Sensitivitätsgrenzen oder zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Serum und Plasma [200, 201]. Aktuelle Studien der Forschungsgruppe um White et al. konnten hingegen bei der Verwendung von Plasma eine deutliche Steigerung der Sensitivität gegenüber Serum oder Vollblut verzeichnen [113]. Jedoch zeigte sich, dass bei der Verwendung von Plasma die Testung von multiplen Plasmaproben notwendig ist, um eine diagnostische Sicherheit im Nachweis zu erzielen [202]. Da Plasma ein einfach zu gewinnendes Probenmaterial darstellt, sollte es in zukünftigen Testungen als zusätzliches klinisches Probenmaterial in die fuPCR mit aufgenommen werden.

In den untersuchten Proben der hämatologischen Patienten konnten des Weiteren keine Spuren von *Penicillium*-DNA nachgewiesen werden. *Penicillium* wird zunehmend als Pilz mit einem bedeutenden pathogenen Potential wahrgenommen und stellt im asiatischen Raum die dritthäufigste opportunistische Infektion in HIV-infizierten Patienten dar. Jedoch zeigt sich diese

Pilzgattung in hohem Maße assoziiert mit AIDS-Erkrankungen [203, 204]. Aktuelle Autopsiestudien verzeichnen bei Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen Nachweisraten von *Penicillium* spp. von null Prozent [205, 206]. Folglich entsprechen die negativen Testergebnisse dieser Studie in Bezug auf *Penicillium*-DNA den literaturbasierten Erwartungen.

Die klinische Bedeutung von *Fusarium*-Infektionen in immunsupprimierten Patienten wurde in der Literatur bereits beschrieben [52, 53]. In der fuPCR wurden zwei Blutserumproben *Fusarium*-positiv getestet. Im Gegensatz zu *Aspergillus* spp. und anderen Schimmelpilzen gehört *Fusarium* zu den wenigen filamentösen Pilzen, die in Blutkulturflaschen wachsen, und die hohe Frequenz an positiven Blutkulturen ist ein charakteristisches Merkmal einer Fusariose [53, 207, 208]. Die Arbeitsgruppen von Bernal-Martínez, Ahmad und Khan haben in neuester Zeit die Detektion von *Fusarium*-DNA in Serumproben als ein hilfreiches Werkzeug für die Diagnose von invasiven Fusariosen beschrieben [209-211]. Unsere Befunde von *Fusarium* spp. in Serumproben mittels fuPCR-Analyse und nicht durch Kultivierung stehen in Übereinstimmung mit diesen Daten und demonstrieren die Fähigkeit der neuartigen fuPCR zur Detektion von *Fusarium* spp. in klinischen Proben.

Die fuPCR-Reaktion B (*Absidia*, *Lichtheimia* & *Cunninghamella*), Reaktion C (*Mucor*, *Rhizomucor* & *Rhizopus*), Reaktion E (*Cryptococcus*) und Reaktion F (*Trichosporon*) fokussierten sich auf den Nachweis selten auftretender Pilze. Obwohl alle Reaktionen in der Lage waren, die isolierte DNA von Referenzstämmen zu amplifizieren, wurden bei der Analyse der klinischen Proben keine Pilze dieser vier Reaktionen gefunden. Spezies dieser Pilze werden bei immunsupprimierten Patienten mit hämatologischen Erkrankungen als „emerging pathogens“ eingestuft. Sie weisen ein großes Gefährdungspotential aufgrund ihrer oft letal verlaufenden Infektionen auf (siehe Kapitel 1.1.3), wurden jedoch bisher nur außerordentlich selten über Kultivierung oder PCR-Nachweis diagnostiziert [212, 213].

Übereinstimmend mit dieser Literaturlage wurde mittels fuPCR in keiner der klinischen Proben ein positiver Nachweis von *Absidia*, *Lichtheimia*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Rhizomucor* oder *Rhizopus* detektiert. Ausgehend von dem bereits bei *Aspergillus* beschriebenen Infektionsweg und dem Überwinden der Blutschranke [191, 192] war die anfängliche Erwartungshaltung, einen positiven Nachweis von Mucorales-DNA in den Blutproben erbringen zu können. In Autopsiestudien wurde gezeigt, dass eine Mucormykose 10- bis 50-fach seltener auftritt als eine Candidiasis oder Aspergillose, mit einer Häufigkeit von 1 bis 5 Fällen pro 10.000 durchgeführte Autopsien [214, 215], wobei die Identifikation von Mucorales in erster Linie auf klassischen mykologischen Diagnostikverfahren wie der Kultivierung basierte [216]. Die Ergebnisse molekularbiologischer Studien im direkten Vergleich mit der Kultur sind zum jetzigen Zeitpunkt wenig verfügbar und weisen ein nur limitiertes Detektions-Spektrum auf (*Lichtheimia* und *Mucor*) [217]. Hierbei ist außerdem hervorzuheben, dass zum Nachweis von Mucorales mittels PCR kultivierte Pilze aus Biopsien (Lunge, Auge, ZNS) [218] oder Biopsiematerial direkt [219-221] als DNA-Quelle verwendet wurden. Diese Verwendung von im Vorfeld kultivierten Pilzen widerspricht jedoch dem

Grundgedanken der fuPCR, DNA direkt aus den klinischen Probenmaterialien zu gewinnen. Die Entnahme von Biopsien bei kritisch kranken Patienten stellt zudem oft ein großes Risiko dar. Nicht zuletzt zeigt dies jedoch, dass diese Pilze in anderen klinischen Materialien als den von uns getesteten vorkommen.

PCR-basierte Methoden für den Nachweis von *Trichosporon* und *Cryptococcus* stellen bislang ebenfalls keinen Goldstandard dar. Eine invasive Trichosporonose wird bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen vor allem als Fungämie (Infektion des Blutkreislaufes mit Pilzen) [60, 222] beschrieben. Vertreter des *Trichosporon*-Genus sind zudem in der Lage, verschiedene Teile des menschlichen Körpers zu kolonisieren, wie das gastrointestinale System und den respiratorischen Trakt [62]. Eine Detektion von *Trichosporon*-DNA wäre aus diesen Gründen sowohl in den Blutproben (EDTA-Blut und Blutserum) als auch in den Rachenabstrichen zu erwarten gewesen. In publizierten PCR-Assays, die sich erfolgreich das ITS-Segment als Zielregion zu eigen machten, wurde jedoch für die Diagnose von *Trichosporon*-Infektionen vornehmlich auf die Verwendung von Gewebebiopsien (Lungenmaterial) als klinisches Probenmaterial zurückgegriffen [223]. Ebenfalls positive Ergebnisse lieferten PCR-Assays, die eine DNA-Extraktion aus in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten (Lungenmaterial) vornahmen [224]. Bei hämatologischen Hochrisikopatienten bleibt jedoch die Problematik der Gewebeentnahme bestehen, weshalb die fuPCR auf die Verwendung von respiratorischen Materialien und Blutproben ausgerichtet wurde. Interessanterweise konnte aber auch der Nachweis von *Trichosporon*-DNA aus Serumproben von Patienten berichtet werden [225], die an einer bereits im Vorfeld bestätigten, disseminierten Trichosporonose erkrankt waren. Die Wahl eines geeigneten Probenmaterials und der Zeitpunkt der Probenentnahme sind für einen molekularbiologischen Nachweis einer *Trichosporon*-Infektion daher ausschlaggebende Faktoren [226].

Der klinische Hintergrund eines Patientenkollektives und vorliegende Grunderkrankungen stellen ebenfalls bedeutende Faktoren beim Nachweis von Pilzinfektionen dar. Auch wenn PCR-basierte Methoden zum Nachweis von *Cryptococcus* bereits publiziert wurden, konzentrieren sich diese Verfahren auf immunsupprimierte Patienten mit einer AIDS-Erkrankung [227, 228]. Auch wenn in aktuellen Berichten *Cryptococcus*-Infektionen in Patienten mit hämatologischen Erkrankungen dokumentiert wurden [229, 230], verbleiben Infektionen mit diesem Keim im hämatologischen Kontext selten [231-233]. Bei einer Infektion sind vornehmlich das zentrale Nervensystem und die Lungen betroffen. Die Diagnose einer *Cryptococcus*-Infektion basiert üblicherweise auf der Isolation des Pilzes aus kultiviertem Gewebe oder Körperflüssigkeiten wie Blut oder Zerebrospinalflüssigkeit [234]. In den analysierten Materialien der vorliegenden Studie konnten jedoch weder in den Rachenabstrichen noch in den Blutproben Spuren von *Cryptococcus*-DNA gefunden werden. Doch bleibt hervorzuheben, dass die publizierten Analysen von Blutproben durch biochemische und immunodiagnostische Tests realisiert wurden [235, 236] und nicht durch den Nachweis von *Cryptococcus*-DNA im Blut. In PCR-basierten Methoden für den direkten Nachweis von *Cryptococcus* in klinischen Proben wurde bislang auf die Verwendung von Biopsien (Lunge und Gehirn), BAL und Zerebrospinalflüssigkeit zurückgegriffen [227, 234, 237, 238]. Neben dem abweichenden Probenmaterial, welches in unserer Studie zur Isolierung der DNA verwendet

wurde, könnte ein weiterer Grund für die negativen Testergebnisse von statistischer Natur sein. So wurde in der SEIFEM-2004-Studie gezeigt, dass lediglich acht Kryptokokkose-Fälle unter 11.802 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen dokumentiert wurden, was einer extrem geringen Inzidenz von 0,07 % gleichkommt [186]. Zudem sind *Cryptococcus*-Infektionen in Deutschland generell nur sehr selten zu beobachten [239]. Die negativen Testergebnisse der fuPCR für *Cryptococcus*-DNA stehen daher in Übereinstimmung mit dem untersuchten Patientenkollektiv.

Als Backup war in der achten Reaktion der fuPCR eine Pan-Pilz-PCR implementiert worden. Die universellen Pan-Fungal-Primer PanF4b, PanF5a, PanF5b und PanF6b waren in der Lage, die isolierte DNA von 12 Pilzspezies zu amplifizieren. Bei Testung klinischer Proben wurden 2,7 % der Proben (10/368) übereinstimmend sowohl mit den universellen Pan-Fungal-Primern als auch mit den entsprechenden familien- und zweigspezifischen Primern positiv auf Pilz-DNA getestet. 73 Proben (19,8 %) wurden jedoch durch die Pan-Fungal-PCR negativ getestet, lieferten aber positive Ergebnisse in den zweig- und familienspezifischen-PCRs. Die Sensitivität der Pan-Fungal-Primer bleibt daher immer noch zu verbessern. Neuere Arbeiten zum breiten Nachweis von Pilzen mittels PCR, die ebenfalls die ITS-Elemente als Zielregion verwenden, zielen oftmals auf phylogenetische Analysen oder eine taxonomische Neuordnung der Pilze ab [128, 240, 241]. Aus diesem Grund müssten sowohl die dort verwendeten Primer nun hinsichtlich ihrer Eignung zum Einsatz in der fuPCR als auch das Vorkommen von Matrixeffekten bei Einsatz von klinischen Proben getestet werden. Bedingt durch die Zielsetzung dieser phylogenetischen Analysen sind die generierten PCR-Produkte oft um ein Vielfaches größer als die Amplifikate der fuPCR. Daher weichen auch die PCR-Bedingungen aufgrund der generierten PCR-Amplifikate mitunter stark von den aktuellen Bedingungen der fuPCR ab. Die Primer ITS1 und IST4 der Forschungsgruppe um White et al. wurden im Rahmen dieser Arbeit an die fuPCR angepasst (ITS4.2) und für die Pan-Fungal-PCR (ITS1) verwendet. Jedoch wurden diese Primer ursprünglich nicht zum Einsatz in Realtime-Assays mit anschließender Schmelzkurvenanalyse entwickelt, sondern für eine Gel-basierte Auswertung [242]. Faktoren wie die Ausbildung von Primerdimeren wurden daher zum Zeitpunkt der Publikation nicht näher in Betracht gezogen. Eine Anpassung an die fuPCR-Bedingungen unter Verkürzung des zu amplifizierenden Bereichs wäre daher zwingend notwendig. Als Alternative zu den ITS-Elementen, die in dieser Studie als Zielregion der PCR verwendet wurden, wurden in Studien mit klinischem Bezug auch die variablen Domänen der 28S-Untereinheit genutzt [243, 244]. In ihrer jetzigen Konzipierung nutzt die fuPCR ausschließlich Regionen im ITS2-Segment des ribosomalen Genclusters, was die Sequenzierung der PCR-Produkte aus jeder der sieben Reaktionen mit dem ITS4.2-Primer ermöglicht. Für die universelle Pan-Fungal-Reaktion jedoch eine andere Zielregion zu wählen, könnte ggf. einen Weg darstellen, die Sensitivität dieser Reaktion zu erhöhen.

In der vorliegenden Studie wurden in der Standardkultivierung der Rachenabstriche lediglich *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida* spp. als Pilzspezies identifiziert (siehe Abbildung 19, Kapitel 3.6.2). Durch die neu entwickelte fuPCR waren wir dagegen zusätzlich in der Lage, die Detektion von seltenen Schimmelpilzen wie beispielsweise *Alternaria* spp. und *Cladosporium* spp.

in den klinischen Proben zu gewährleisten, die in der ursprünglichen Konzeption der fuPCR nicht gesondert betrachtet worden waren. Dies ist insbesondere bedeutsam, da Schimmelpilze des Genus *Alternaria* in jüngster Zeit als Verursacher von Infektionen des Menschen beschrieben wurden [245]. In immunsupprimierten Patienten konnte gezeigt werden, dass *Alternaria* opportunistische Infektionen hervorruft [246] und von pathophysiologischer Bedeutung für Patienten mit hämatologischen Erkrankungen ist [247]. Im Verlauf dieser Studie wurden insgesamt drei Rachenabstriche positiv auf DNA von *Alternaria* spp. getestet. Die Rhinosinuitis stellt eine prominente klinische Manifestation einer *Alternaria*-Infektion in immunsupprimierten Menschen dar [248], und in respiratorischen Materialien wie BAL konnten diese Erreger in 8,6 % der klinischen Proben identifiziert werden [249]. Sogar von pulmonalen Infektionen wurde berichtet [250], was die klinische Bedeutsamkeit einer schnellen Detektion von *Alternaria* spp. in klinischen Materialien von immunsupprimierten Patienten nahelegt, die nun durch Anwendung der fuPCR auch möglich ist.

Zusätzlich wurde eine geringe Anzahl an Vollblutproben (n=4) in der fuPCR-Analyse positiv auf Pilz-DNA von *Cladosporium* getestet. *Cladosporium* wurde bislang nicht als Pathogen in Assoziation mit Pneumonien beschrieben [245, 251]. Die Gegenwart dieses Pilzes in Blutproben wurde vielmehr als Kontamination durch eine umweltbezogene Quelle angesehen, wodurch eine Pseudofungämie suggeriert wurde [252, 253]. Bemerkenswerterweise beschreibt jedoch eine zunehmende Anzahl an neueren Studien das pathogene Potential von *Cladosporium* spp. [254-256] als Verursacher von schweren Infektionen des zentralen Nervensystems und des respiratorischen Traktes [257, 258]. Bedingt durch die Tatsache, dass *Cladosporium* und *Alternaria* die wichtigsten aerogen zirkulierenden und ubiquitär vorkommenden Schimmelpilze sind [259], wurden sie als prominente Krankheitsverursacher von allergischen bronchopulmonalen Mykosen und Asthmaanfällen beschrieben [260, 261]. Unter Patienten mit tiefgreifender Neutropenie (bedingt durch eine vorangegangene Stammzelltransplantation) waren sogar 14,6 % aller Blutkulturen positiv für *Cladosporium* spp., einschließlich eines letalen Ausgangs einer Fungämie durch eine Koinfektion von *Penicillium* und *Cladosporium* spp. [262]. Demzufolge ist *Cladosporium* ein pathogenes Potential zuzuschreiben und die fuPCR liefert auch hier ein hilfreiches Verfahren für die schnelle Detektion dieser Pilzgattung.

Bei einer allgemeinen Betrachtung der fuPCR-Ergebnisse zeigte der Vergleich von 56 Rachenabstrichen und Blutproben von immunsupprimierten Patienten, sowohl mittels fuPCR-Assay als auch durch eine parallele Kultivierung der respiratorischen Proben, dass der Einsatz der fuPCR im Allgemeinen signifikant schneller als die parallel durchgeführte Standard-Kultivierungsmethode war. Erste Ergebnisse lagen somit bereits nach vier Stunden vor. Ein endgültiger kultureller Nachweis von Pilzen konnte erst nach einer abschließenden Bebrütungszeit von 12 Tagen erbracht werden. Sequenzierungsergebnisse für eine eindeutige Identifizierung der durch fuPCR nachgewiesenen Pilzspezies konnten bereits innerhalb eines Tages gewonnen werden. Zudem war die fuPCR-Analyse der Rachenabstriche insgesamt sensitiver als die parallel durchgeführte Standardkultivierung. Durch die fuPCR konnten 35 Pilze (62,5 %; 35/56) detektiert werden, wohingegen kulturell lediglich 17 Pilze (30,4 %; 17/56) nachgewiesen



werden konnten (siehe Kapitel 3.6.2). Pilzspezies, die in respiratorischen Materialien von immunsupprimierten Patienten durch beide Methoden (fuPCR und Kultivierung) identifiziert wurden, korrelierten zu 100 % und stimmten in ihrer Identität überein. Interessanterweise korrelierten jedoch die in Rachenabstrichen detektierten Pilzspezies nicht mit denen, die in den Blutproben (EDTA-Blut und Blutserum) des jeweiligen Patienten gefunden wurden. Die Bedeutung dieses Befundes ist schwierig zu bewerten, da sich vergleichbare Studien primär auf den Gebrauch eines einzelnen klinischen Probenmaterials beschränkten. Ein umfassender Vergleich von Patientenmaterialien unterschiedlicher Herkunft wurde hier nicht durchgeführt [55, 100].

In der Validation der fuPCR mit klinischen Probensets (Rachenabstrichen, EDTA-Blut und Blutserum) von immunsupprimierten, hämatologischen Patienten (siehe Kapitel 3.6) konnten von 50 getesteten Probensets erfolgreich acht Probensets ermittelt werden, in denen jeweils zwei unterschiedliche Pilze detektiert wurden. Vier von diesen acht Probensets stammten von immunsupprimierten Patienten mit nachgewiesener Pneumonie (siehe Kapitel 3.6.2). Dies stellt anschaulich unter Beweis, dass mittels fuPCR pathogene Pilze aus unterschiedlichen fuPCR-Reaktionen (A - G, siehe Kapitel 3.3) simultan in einer einzigen klinischen Probe detektiert und identifiziert werden können.

Die Kultivierung von Pilzen auf Festnährböden ist aus Blutproben in der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene nicht etabliert. So war eine Bestätigung der fuPCR-detektierten Pilze in den Blutproben (EDTA-Blut und Blutserum) mittels Pilzkultivierung nicht möglich. Wurden Pilze in den Blutproben per fuPCR festgestellt, dienten diese Resultate daher als Nebenbefunde dieser Pilotstudie. Andererseits stellt die Diagnose von *Candida* und *Cryptococcus* nach Anzucht in Blutkulturflaschen einen validierten Prozess in der Routinediagnostik unseres Institutes dar. Für 36 von 50 (72 %) immunsupprimierten Patienten waren neben den fuPCR-analysierten Blutproben (EDTA-Blut und Blutserum) zeitgleich gesonderte Blutkulturen angelegt worden. Die 28 Patienten mit Pneumonie wurden übereinstimmend mittels Blutkultur und fuPCR (an Blutproben) negativ auf Pilze getestet (siehe Kapitel 3.6.3). Im Rahmen der klinischen Untersuchungen wurden bei diesen Patienten keine Pilze als Verursacher der Pneumonie festgestellt.

### 4.3 Die Ergebnisse der fuPCR im klinischen Kontext

Bei einer Bewertung der fuPCR-Ergebnisse für die analysierten Proben der hämatologischen Patienten ist zu berücksichtigen, dass die meisten immunsupprimierten Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme entweder eine indizierte antimykotische Behandlung oder eine antimykotische Prophylaxe erhalten hatten. Die Auswirkungen auf das Spektrum der detektierten Pilze sind daher nur schwer abzuschätzen. Jedoch stellt diese Medikation der Patienten womöglich eine Erklärung dar, warum im Rahmen dieser Studie alle Rachenabstriche und Blutproben negativ für *Aspergillus*-DNA getestet wurden. Seltene filamentöse Schimmelpilze wie *Cladosporium*, *Alternaria* und *Fusarium* zeigten im Gegensatz zu *Aspergillus* spp. abweichende Suszeptibilitäts- und Resistenzmuster gegenüber antimykotischen Wirkstoffen [255, 256, 263]. Die antimykotische Prophylaxe der immunsupprimierten Patienten könnte daher zu einer Beseitigung von sensiblen Pilzen wie *Aspergillus* und *Candida* geführt haben. Diese Beseitigung von bestimmten Pilzgenera könnte wiederum letztlich eine Verlagerung des Erregerspektrums hin zu resistenteren Pilzen wie *Cladosporium*, *Alternaria* und *Fusarium* zur Folge gehabt haben.

Der Einfluss von antimykotischen Wirkstoffen auf den PCR-basierten Pilznachweis ist bis zum heutigen Tag nicht vollständig durch Studien geklärt. Studien der Arbeitsgruppen um Reinwald, Springer und Lass-Flörl zeigten jedoch in ersten Ansätzen deutlich, dass die Anwendung einer antimykotischen Prophylaxe vor oder aber im Zuge der Probenentnahme einen erkennbaren Einfluss auf eine PCR-basierte Diagnostik hat. Die Sensitivitäten von PCR-Assays und damit ihre Detektionsraten wurden in signifikantem Maß reduziert [264-266]. Diese Berichte zeigten zudem mögliche Szenarien einer Prophylaxe auf, bei denen die Behandlung mit antimykotischen Wirkstoffen zu einer Entfernung von fungalen Zellen im Blut führt, ohne dabei aber bereits in der Lunge verbreitete Pilze vollständig zu beseitigen [267]. Gegensätzliche Ergebnisse konnten in den Arbeiten von Bernal-Martinez und Suarez gefunden werden, deren Forschungsgruppen sich auf die Verarbeitung von Vollblut und Blutserum konzentrierten. Die Proben wurden von immunsupprimierten Patienten mit hämatologischen Erkrankungen entnommen, bei denen zudem eine hämatopoetische Stammzelltransplantation durchgeführt worden war. In den Analysen von Patienten, die gemäß den EORTC/MSG Kriterien (EORTC/MSG: „proven“, „probable“ oder „possible“ [21]) als „possible“ für eine invasive Pilzinfektion klassifiziert wurden, konnten positive Pilz-PCR-Ergebnisse erzielt werden [268, 269]. In weiterführenden Arbeiten sollte aus diesem Grund ein zusätzlicher Fokus auf dieses Patientenkollektiv gesetzt werden. Durch eine stringente Klassifizierung der Patienten anhand der Kriterien der EORTC/MSG können die Ergebnisse der fuPCR konsistenter mit anderen Diagnostikverfahren verglichen werden. Zudem kann sich eine Beurteilung der fuPCR-Befunde im Hinblick auf ihre klinische Relevanz einfach gestalten, sofern die Patienten einheitlich bezüglich ihrer antimykotischen Behandlung oder Prophylaxe charakterisiert werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt konzentriert sich die fuPCR auf immunsupprimierte Patienten mit hämatologischen Erkrankungen. Die fuPCR bietet durch ihren modulären Aufbau die Möglichkeit, auch noch weitere Pilzspezies nachweisbar zu machen. Immunsupprimierte Patienten mit primären Grunderkrankungen wie HIV weisen neben *Cryptococcus*-Infektionen [270, 271] oftmals Infektionen mit anderen Pilzen wie *Pneumocystis jirovecii* auf [272, 273]. Neben ihrem Bedrohungspotential für HIV-Patienten scheinen *Pneumocystis*-Infektionen von zunehmender klinischer Relevanz für hämatologische Patienten und für Empfänger von Stammzelltransplantationen zu sein [274, 275]. Ausgehend von den sieben familien- und zweigspezifischen Reaktionen der „First Line“-PCR für den Nachweis von Pilzinfektionen könnte die fuPCR um eine weitere Reaktion für den Nachweis von *Pneumocystis* erweitert werden oder alternativ der *Pneumocystis*-Nachweis einer zweigspezifischen PCR (A-G) hinzugefügt werden.

Neben einer solchen Erweiterung um einzelne Reaktionen bestünde auch die Möglichkeit, die aktuelle „Second Line“-PCR zu erweitern, die sich momentan nur auf die bedeutendsten *Aspergillus*- und *Candida*-Spezies beschränkt. Durch die Generierung von zusätzlichen speziesspezifischen-Sonden könnte direkt im Anschluss an den fuPCR-Lauf die Identifizierung der Pilzspezies einer positiven Zweig-PCR ausgeweitet werden. Eine Sequenzierung dieser PCR-Amplifikate könnte dann ebenfalls entfallen und Informationen über die vorliegende Pilzspezies wären schon innerhalb weniger Stunden verfügbar, wie dies in der aktuell angewendeten Methodik für *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* und *A. terreus*) sowie *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* und *C. krusei*) der Fall ist. Alternativ könnten auch familienspezifische Sonden entwickelt werden, um diese bereits in der „First Line“-PCR als Alternative zu einer SYBR-Green-PCR einzusetzen. So könnten diese Sonden beispielsweise in DNA-Abschnitten binden, welche in den Pilzen *Mucor*, *Rhizomucor* und *Rhizopus* (Reaktion C) konserviert sind und, durch unterschiedliche Fluorophormarkierungen unterscheidbar, bereits nach dem ersten PCR-Lauf Informationen über die im klinischen Material enthaltenen Pilze liefern.

Die Auswahl der DNA-Isolierungsmethode aus einem klinischen Material ist ebenfalls ein essentieller Punkt für die Leistungsfähigkeit der fuPCR. Auch wenn die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Blutproben nur wenige positive Testresultate lieferten (4,8 % der EDTA-Blutproben und 1,4 % der Blutseren gegenüber 50,8 % der Rachenabstriche), ist die Bedeutung von Blutproben für den PCR-basierten Nachweis von invasiven Pilzen nachweislich dokumentiert [28, 78, 276]. Vor allem bei Patienten mit schwerer Candidämie konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass Blutserum ein geeignetes Probenmaterial darstellt [276]. Insbesondere in Blutproben zeichnete sich daher im Verlauf der letzten Jahre zunehmend ein Konsens für eine bestimmte DNA-Präparation ab. So konnte beobachtet werden, dass vor allem die gezielte Lyse von humanen Leukozyten einen positiven Effekt auf die Sensitivitätsgrenzen von PCR-Methoden hatte [163, 190]. Die Eignung von Rachenabstrichen als klinisches Probenmaterial des respiratorischen Traktes und ihre Aufarbeitung sollten in zukünftigen Arbeiten untersucht werden. In den analysierten Rachenabstrichen der hämatologischen Patienten wurden vornehmlich *Candida* spp. nachgewiesen, bei denen es sich aller Voraussicht nach um

kolonisierende Arten handelt. Ein Nachweis von *Aspergillus* spp. konnte in den untersuchten Rachenabstrichen hingegen nicht erbracht werden, auch wenn *Aspergillus* gemäß der Literaturlage vornehmlich in respiratorischen Proben nachzuweisen war [78, 112, 189, 190]. Das Probenmaterial ist jedoch einfach und ohne Nachteile für den Patienten zu gewinnen und stellt wie bereits beschrieben eine potentielle Vorstufe für eine folgende Sepsis dar [187, 188].

Weitere Faktoren, die letztlich die Leistungsfähigkeit eines PCR-Assays beeinflussen, stellen die Quantität und Qualität der DNA-Extraktion aus den jeweiligen klinischen Proben dar. Die Notwendigkeit, PCR-inhibierende Substanzen aus den Probenmaterialien zu entfernen, konnte bereits in anderen Arbeiten verdeutlicht werden [277]. Eine solche Anpassung vermag die Leistung eines PCR-Assays weiter zu steigern und könnte letztlich in einer gesteigerten Sensitivität resultieren. Je nach Patientenkollektiv und vermutetem Infektionsort kann die Art und Quantität des vom Patienten gewonnenen Probenmaterials variieren. Während Blut ein einfach zu gewinnendes, klinisches Material darstellt, ist die Entnahme einer Biopsie vom Zustand des Patienten abhängig und die Menge des gewonnenen Materials begrenzt [24, 28, 78]. So hat letztlich die anfängliche Auswahl des Probenvolumens für die DNA-Extraktion eine entscheidende Auswirkung auf die Leistung einer PCR [278]. Obwohl im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden konnte, dass die Sensitivität der fuPCR bereits in ihrem jetzigen Zustand die als Goldstandard geltende Standardkultivierung übertrifft, kann eine künftige Anpassung und Optimierung der DNA-Extraktion an das klinische Probenmaterial eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, um die Leistungsfähigkeit der fuPCR weiter zu steigern und somit die Sensitivität und Detektion von Schimmelpilzen zu verbessern.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde mit der fuPCR ein neuartiger Realtime-PCR-Assay entwickelt und für die schnelle Identifikation und Differenzierung von invasiven Pilzen in immunsupprimierten Patienten mit hämatologischen Erkrankungen getestet.

Als Zielregion für die fuPCR wurde das ITS2-Segment (internal transcribed spacer 2) des ribosomalen Genclusters ausgewählt. Insgesamt wurden 1521 verschiedene ITS1-ITS2-Sequenzen von 71 Pilzspezies im Rahmen einer umfassenden Datensammlung aus Datenbanken selektiert. Diese Sequenzen bildeten in einem multiplen Sequenzalignment die Grundlage für den Entwicklungsprozess von 16 familien- und zweigspezifischen Forwardprimern für die sieben pilzdifferenzierenden Multiplexreaktionen des fuPCR-Assays in Kombination mit dem universellen ITS4.2-Reversprimer. Mithilfe isolierter Pilz-DNA von Referenzstämmen wurde die Funktionalität der einzelnen PCR-Reaktionen, A - G, validiert. Die sieben Reaktionen der fuPCR ermöglichen als „First Line“-PCR den Nachweis der 13 medizinisch relevanten Pilz-Genera *Aspergillus* & *Penicillium* (Reaktion A); *Absidia*, *Cunninghamella* & *Lichtheimia* (Reaktion B); *Mucor*, *Rhizomucor* & *Rhizopus* (Reaktion C); *Fusarium* & *Scedosporium* (Reaktion D); *Cryptococcus* (Reaktion E); *Trichosporon* (Reaktion F) und *Candida* (Reaktion G). Darüber hinaus wurden für die unter hämatologischen Patienten weitverbreiteten Pilzgattungen *Aspergillus* und *Candida* jeweils vier speziesspezifische TaqMan-Sonden entwickelt (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* sowie *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* und *C. krusei*), die in einem nachgeschalteten „Second Line“-TaqMan-PCR-Assay die Identifizierung dieser Spezies ermöglichten und die Sangersequenzierung überflüssig machten.

Die fuPCR wurde an klinischen Proben (EDTA-Blut, Blutserum und Rachenabstriche) von 50 Patienten mit schweren hämatologischen Erkrankungen und 30 gesunden Individuen getestet. Anfänglich wurden 198 Proben von immunsupprimierten Patienten mit der neuartigen fuPCR untersucht. Dabei wurden 50,8 % (33/65) der Rachenabstriche, 4,8 % (3/63) der EDTA-Blutproben und 1,4 % (1/70) der Blutserum-Proben positiv getestet. Anschließend wurden 56 Rachenabstriche von immunsupprimierten Patienten und 30 gesunden Individuen vergleichend mittels fuPCR und mikrobiologischer Standardkultivierung analysiert. Durch beide Methoden übereinstimmend wurden 30,4 % (17/56) der Rachenabstriche von immunsupprimierten Patienten positiv und 37,5 % (21/56) negativ getestet. 32,1 % (18/56) der Rachenabstriche wurden positiv durch die fuPCR und zeitgleich negativ durch die Kultivierung getestet. Bei einer Analyse der Blutproben der immunsupprimierten Patienten wurden 5,4 % (3/56) des EDTA-Bluts und 16,1 % (9/56) des Blutserums positiv durch die fuPCR getestet. Alle analysierten Proben der 30 gesunden Probanden waren fuPCR-negativ.

Bei Betrachtung des Keimspektrums gehörten 38,9 % (14/36) der in den Rachenabstrichen gefundenen Pilze zu *Candida* spp., 47,2 % (17/36) zu *Saccharomyces* spp., 5,6 % (2/36) zu *Cladosporium* spp. und 8,3 % (3/36) zu *Alternaria* spp. Mittels Kultivierung konnten dahingegen nur *Candida* spp. (10/17) und *Saccharomyces* spp. (7/17) in den Rachenabstrichen identifiziert werden. Bei Betrachtung der Anamnese der immunsupprimierten Patienten wurde ersichtlich, dass 5 von 14 Patienten (35,7 %) mit fuPCR-positiv getesteten Blutproben eine gemäß der EORTC/MSG-Kriterien mögliche fungale Pneumonie aufwiesen.

Diese Arbeit umfasst einen systematischen, methodenbasierten Ansatz für die Detektion von Pilzen (fuPCR) bei hämatologischen Patienten und kann in ihrem Umfang jederzeit für andere relevante Pilze angepasst und um diese erweitert werden. Bei einem Vergleich mit der als Goldstandard geltenden Kultivierung lieferte die fuPCR überlegene Resultate: Die Ergebnisse der fuPCR-Analysen waren schneller verfügbar, sie waren sensitiver und lieferten eine sofortige Identifikation der Pilzgruppe. Die fuPCR trägt somit ein großes Potential in sich und kann ein wertvolles diagnostisches Werkzeug für die schnelle Detektion von Pilzinfektionen bei Hochrisikopatienten sein.

## 6 SUMMARY

In this work the fuPCR, a novel real-time PCR assay, was developed for the rapid identification and differentiation of invasive fungi in immunosuppressed patients with haematological diseases.

The fungal ITS2 region (Internal Transcribed Spacer 2) that belongs to the ribosomal DNA gene cluster was targeted in the fuPCR assay. A comprehensive data collection from various databases was carried out and a total of 1521 different ITS1-ITS2 sequences representing 71 fungal species were selected. The above-mentioned sequences served as templates in a multiple sequence alignment and were used to design a set of 16 family- and branch specific forward primers which were combined with the universal reverse primer ITS4.2. For fungal identification and differentiation, a set of seven multiplex reactions for the fuPCR assay was prepared using the designed primers. Using isolated fungal DNA from reference strains, the functionality of each PCR reaction (A - G) was validated. In a "First Line" PCR, the seven reactions of the fuPCR enabled the identification of 13 clinically relevant fungal genera namely *Aspergillus* & *Penicillium* (Reaction A); *Absidia*, *Cunninghamella* & *Lichtheimia* (Reaction B); *Mucor*, *Rhizomucor* & *Rhizopus* (Reaction C); *Fusarium* & *Scedosporium* (Reaction D); *Cryptococcus* (Reaction E); *Trichosporon* (Reaction F) and *Candida* (Reaction G). In addition, a "Second Line" PCR assay was performed using eight different TaqMan probes targeting the fungal species *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. The purpose of this second PCR assay was to screen for the fungi *Aspergillus* and *Candida*, which are commonly found in patients with haematological disorders and a successful identification of these species made sanger sequencing superfluous.

The fuPCR was tested on clinical samples (throat swabs, EDTA blood and blood sera) from 50 patients with severe haematological diseases and 30 healthy individuals. Initially, 198 samples derived from immunosuppressed patients were analyzed using the novel fuPCR. 50.8 % (33/65) of the throat swabs, 4.8 % (3/63) of the EDTA blood samples and 1.4 % (1/70) of the blood serum samples were tested positive. Subsequently, 56 throat swabs of immunosuppressed patients and 30 of healthy individuals were simultaneously analysed by fuPCR and standard microbiological cultivation techniques. Consistent with both methods, 30.4 % (17/56) of throat swabs from immunosuppressed patients were tested positive and 37.5 % (21/56) negative. 32.1 % of throat swabs were tested positive by fuPCR and negative by culture at the same time. In an analysis of blood samples from immunosuppressed patients, 5.4 % (3/56) of EDTA blood and 16.1 % (9/56) of blood serum samples were positively tested by fuPCR. All analyzed samples from the 30 healthy individuals were tested negative by fuPCR.

A closer analysis of the pathogen spectrum showed that 38.9 % (14/36) of the fungi detected in throat swabs belonged to *Candida* spp., 47.2 % (17/36) to *Saccharomyces* spp., 5.6 % (2/36) to

*Cladosporium* spp. and 8.3 % (3/36) to *Alternaria* spp. In contrast, only *Candida* spp. (10/17) and *Saccharomyces* spp. (7/17) could be identified in throat swabs by standard cultivation techniques. Considering the anamnesis of the immunosuppressed patients, 5 out of 14 patients (35.7 %) whose blood samples tested positive on the basis of fuPCR were also confirmed to be suffering from fungal pneumonia according to the EORTC/MSG criteria.

This work comprises a systematic, method based approach for the detection of fungi (fuPCR) in patients suffering from haematological diseases and can be adapted and extended at any time for other relevant fungi. In comparison to the as gold standard considered cultivation techniques, the fuPCR yielded superior results: The results of the fuPCR analysis were available faster, more sensitive, and provided immediate identification of the fungal branch. The fuPCR has a great potential and can be employed as a valuable diagnostic tool for the quick detection of fungal infections in high risk patients.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Perloth, J., B. Choi, and B. Spellberg, *Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment*. *Med Mycol*, 2007. **45**(4): p. 321-46.
2. Chen, Y., et al., *Trends in chronic myeloid leukemia incidence and survival in the United States from 1975 to 2009*. *Leuk Lymphoma*, 2013. **54**(7): p. 1411-7.
3. Borg-von Zepelin, M., et al., *Epidemiology and antifungal susceptibilities of Candida spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005*. *J Antimicrob Chemother*, 2007. **60**(2): p. 424-8.
4. Gullo, A., *Invasive fungal infections: the challenge continues*. *Drugs*, 2009. **69 Suppl 1**: p. 65-73.
5. Richardson, M.D., *Changing patterns and trends in systemic fungal infections*. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **56 Suppl 1**: p. i5-i11.
6. Brown, G.D., et al., *Hidden killers: human fungal infections*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(165): p. 165rv13.
7. Paganini, H., et al., *Outpatient, sequential, parenteral-oral antibiotic therapy for lower risk febrile neutropenia in children with malignant disease: a single-center, randomized, controlled trial in Argentina*. *Cancer*, 2003. **97**(7): p. 1775-80.
8. Ammann, R.A., A. Simon, and E.S. de Bont, *Low risk episodes of fever and neutropenia in pediatric oncology: Is outpatient oral antibiotic therapy the new gold standard of care?* *Pediatr Blood Cancer*, 2005. **45**(3): p. 244-7.
9. Laws, H.J., R.A. Ammann, and T. Lehrnbecher, *[Diagnostic procedures and management of Fever in pediatric cancer patients]*. *Klin Padiatr*, 2005. **217 Suppl 1**: p. S9-16.
10. Morrell, M., V.J. Fraser, and M.H. Kollef, *Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(9): p. 3640-5.
11. Lam, S.W., G.A. Eschenauer, and P.L. Carver, *Evolving role of early antifungals in the adult intensive care unit*. *Crit Care Med*, 2009. **37**(5): p. 1580-93.
12. Havlickova, B., V.A. Czaika, and M. Friedrich, *Epidemiological trends in skin mycoses worldwide*. *Mycoses*, 2008. **51 Suppl 4**: p. 2-15.
13. Kaushik, N., G.G. Pujalte, and S.T. Reese, *Superficial Fungal Infections*. *Prim Care*, 2015. **42**(4): p. 501-16.
14. Ameen, M., *Epidemiology of superficial fungal infections*. *Clin Dermatol*, 2010. **28**(2): p. 197-201.
15. Singh, N., *Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices*. *Clin Infect Dis*, 2001. **33**(10): p. 1692-6.
16. Hof, H., *IFI = invasive fungal infections. What is that? A misnomer, because a non-invasive fungal infection does not exist!* *Int J Infect Dis*, 2010. **14**(6): p. e458-9.
17. Badiee, P., et al., *Study on invasive fungal infections in immunocompromised patients to present a suitable early diagnostic procedure*. *Int J Infect Dis*, 2009. **13**(1): p. 97-102.
18. Morar, N., et al., *Tinea capitis in Kwa-Zulu Natal, South Africa*. *Pediatr Dermatol*, 2004. **21**(4): p. 444-7.
19. Brasch, J., *Current knowledge of host response in human tinea*. *Mycoses*, 2009. **52**(4): p. 304-12.

20. Lian, C.H. and W.D. Liu, *Differential expression of Candida albicans secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis*. Mycoses, 2007. **50**(5): p. 383-90.
21. De Pauw, B., et al., *Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(12): p. 1813-21.
22. Muskett, H., et al., *Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review*. Crit Care, 2011. **15**(6): p. R287.
23. Füssle, R., *Invasive Pilzinfektionen bei kritisch kranken Patienten. Invasive fungal infections in critically-ill patients*. Vol. 53. 2012. 523.
24. Bhatti, Z., et al., *Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. Mycopathologia, 2006. **162**(1): p. 1-15.
25. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema, *Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(1): p. 133-63.
26. Blumberg, H.M., et al., *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, 2001. **33**(2): p. 177-86.
27. Müller-Löbnitz, C., *Mykosen auf der Intensivstation. Aktuelle diagnostische und therapeutische Aspekte*. Chemother J, 2010. **7**: p. 13-17.
28. Badiee, P. and Z. Hashemizadeh, *Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management*. Indian J Med Res, 2014. **139**(2): p. 195-204.
29. Mora, C., et al., *How many species are there on Earth and in the ocean?* PLoS biology, 2011. **9**(8): p. e1001127.
30. Brown, G.D., D.W. Denning, and S.M. Levitz, *Tackling human fungal infections*. Science, 2012. **336**(6082): p. 647.
31. Ostrosky-Zeichner, L. and P.G. Pappas, *Invasive candidiasis in the intensive care unit*. Crit Care Med, 2006. **34**(3): p. 857-63.
32. Farmakiotis, D. and D.P. Kontoyiannis, *Emerging issues with diagnosis and management of fungal infections in solid organ transplant recipients*. Am J Transplant, 2015. **15**(5): p. 1141-7.
33. Badiee, P., et al., *Fungal infections in solid organ recipients*. Exp Clin Transplant, 2005. **3**(2): p. 385-9.
34. Pfaller, M.A., et al., *Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of Candida in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008*. PLoS One, 2014. **9**(7).
35. Tortorano, A.M., et al., *Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance*. International journal of antimicrobial agents, 2006. **27**(5): p. 359-366.
36. Dimopoulos, G., et al., *Candida albicans versus non-albicans intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome*. Anesth Analg, 2008. **106**(2): p. 523-9, table of contents.
37. Kuhn, D.M., et al., *Candida parapsilosis characterization in an outbreak setting*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(6): p. 1074-81.
38. Chowdhary, A., et al., *An outbreak of candidemia due to Candida tropicalis in a neonatal intensive care unit*. Mycoses, 2003. **46**(8): p. 269-274.
39. McCarthy, K.M., et al., *Population-based surveillance for cryptococcosis in an antiretroviral-naive South African province with a high HIV seroprevalence*. AIDS, 2006. **20**(17): p. 2199-206.
40. Colombo, A.C. and M.L. Rodrigues, *Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis*. An Acad Bras Cienc, 2015: p. 0.
41. Prado, M., et al., *Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(3): p. 513-21.

42. Pappas, P.G., et al., *Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET)*. Clin Infect Dis, 2010. **50**(8): p. 1101-11.
43. Nicolle, M.C., et al., *Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009*. Haematologica, 2011. **96**(11): p. 1685-91.
44. Lin, S.J., J. Schranz, and S.M. Teutsch, *Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(3): p. 358-66.
45. Schwartz, H.J. and P.A. Greenberger, *The prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma, determined by serologic and radiologic criteria in patients at risk*. J Lab Clin Med, 1991. **117**(2): p. 138-42.
46. Maschmeyer, G., et al., *Diagnosis and antimicrobial therapy of lung infiltrates in febrile neutropenic patients: Guidelines of the infectious diseases working party of the German Society of Haematology and Oncology*. Eur J Cancer, 2009. **45**(14): p. 2462-72.
47. Kriengkauykiat, J., J.I. Ito, and S.S. Dadwal, *Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections*. Clin Epidemiol, 2011. **3**: p. 175-91.
48. Low, C.Y. and C. Rotstein, *Emerging fungal infections in immunocompromised patients*. F1000 Med Rep, 2011. **3**.
49. Person, A.K., D.P. Kontoyiannis, and B.D. Alexander, *Fungal Infections in Transplant and Oncology Patients*. Infect Dis Clin North Am, 2010. **24**(2): p. 439-59.
50. Sharma, C. and A. Chowdhary, *Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi*. Int J Antimicrob Agents, 2017.
51. Pujol, I., et al., *In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental Fusarium spp. strains*. J Antimicrob Chemother, 1997. **39**(2): p. 163-7.
52. Dignani, M.C. and E. Anaissie, *Human fusariosis*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10 Suppl 1**: p. 67-75.
53. Nucci, M. and E. Anaissie, *Fusarium Infections in Immunocompromised Patients*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 695-704.
54. Ochi, Y., et al., *Infective endocarditis caused by Scedosporium prolificans infection in a patient with acute myeloid leukemia undergoing induction chemotherapy*. Int J Hematol, 2015. **101**(6): p. 620-5.
55. Sugawara, Y., et al., *Clinical utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders*. Eur J Haematol, 2013. **90**(4): p. 331-9.
56. Cortez, K.J., et al., *Infections Caused by Scedosporium spp.* Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(1): p. 157-97.
57. Caira, M., et al., *Uncommon yeast infections in hematological patients: from diagnosis to treatment*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011. **9**(11): p. 1067-75.
58. Suzuki, K., et al., *Fatal Trichosporon fungemia in patients with hematologic malignancies*. Eur J Haematol, 2010. **84**(5): p. 441-7.
59. Pfaller, M.A., et al., *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, 2010. **48**(4): p. 1366-77.
60. Kontoyiannis, D.P., et al., *Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome*. Scand J Infect Dis, 2004. **36**(8): p. 564-9.
61. Girmenia, C., et al., *Invasive infections caused by Trichosporon species and Geotrichum capitatum in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(4): p. 1818-28.
62. Colombo, A.L., A.C. Padovan, and G.M. Chaves, *Current knowledge of Trichosporon spp. and Trichosporonosis*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(4): p. 682-700.
63. Sautour, M., et al., *Dynamics of fungal colonization in a new medical mycology laboratory*. J Mycol Med, 2012. **22**(1): p. 14-20.

64. Chowdhary, A., et al., *Voriconazole-Resistant Penicillium oxalicum: An Emerging Pathogen in Immunocompromised Hosts*. Open Forum Infect Dis, 2014. **1**(2): p. ofu029.
65. Chan, J.F., et al., *Talaromyces (Penicillium) marneffeii infection in non-HIV-infected patients*. Emerging microbes & infections, 2016. **5**(3): p. e19.
66. Supparatpinyo, K., et al., *Disseminated Penicillium marneffeii infection in southeast Asia*. The Lancet, 1994. **344**(8915): p. 110-113.
67. Wong, J., P. Ballal, and P.G. Arndt, *Emerging Pulmonary Fungal Isolates From Patients With Hematologic Malignancies*, in B64. FUNGAL INFECTIONS AND INFECTIONS IN NON-HIV IMMUNOCOMPROMISED HOSTS. 2017, Am Thoracic Soc. p. A4015-A4015.
68. Atalay, A., et al., *Pulmonary infection caused by Talaromyces purpurogenus in a patient with multiple myeloma*. Infez Med, 2016. **24**: p. 153-157.
69. Pagano, L., et al., *Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66 Suppl 1**: p. i5-14.
70. Kontoyiannis, D.P. and R.E. Lewis, *How I treat mucormycosis*. Blood, 2011. **118**(5): p. 1216-24.
71. Chayakulkeeree, M., M.A. Ghannoum, and J.R. Perfect, *Zygomycosis: the re-emerging fungal infection*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006. **25**(4): p. 215-29.
72. Skiada, A., et al., *Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3)*. Haematologica, 2013. **98**(4): p. 492-504.
73. Hoffmann, K., S. Discher, and K. Voigt, *Revision of the genus Absidia (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant Absidia spp. form a coherent group, Mycocladiaceae fam. nov.* Mycol Res, 2007. **111**(Pt 10): p. 1169-83.
74. Hoffmann, K., G. Walther, and K. Voigt, *Mycocladus vs. Lichtheimia: a correction (Lichtheimiaceae fam. nov., Mucorales, Mucoromycotina)*. Mycol Res, 2009(113): p. 277-278.
75. Alvarez, E., et al., *Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(6): p. 1650-6.
76. Gomes, M.Z.R., R.E. Lewis, and D.P. Kontoyiannis, *Mucormycosis Caused by Unusual Mucormycetes, Non-Rhizopus, -Mucor, and -Lichtheimia Species*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(2): p. 411-45.
77. Guery, B.P., et al., *Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part II. Treatment*. Intensive Care Med, 2009. **35**(2): p. 206-14.
78. Schelenz, S., et al., *British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases*. Lancet Infect Dis, 2015. **15**(4): p. 461-74.
79. Kozel, T.R. and B. Wickes, *Fungal diagnostics*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(4): p. a019299.
80. Gazzoni, A.F., et al., *Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2009. **51**(5): p. 255-9.
81. Galgóczy, L., *Molecular characterization of opportunistic pathogenic zygomycetes*. Acta Biol Szeged, 2005. **49**(3-4): p. 1-7.
82. Kami, M., et al., *Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with haematological malignancy*. Br J Haematol, 2002. **117**(1): p. 40-6.
83. Ostrosky-Zeichner, L., *Invasive mycoses: diagnostic challenges*. Am J Med, 2012. **125**(1 Suppl): p. S14-24.
84. Kontoyiannis, D.P., et al., *Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(1): p. 188-9.
85. Wirk, B. and J.R. Wingard, *Current approaches in antifungal prophylaxis in high risk hematologic malignancy and hematopoietic stem cell transplant patients*. Mycopathologia, 2009. **168**(6): p. 299-311.

86. Arvanitis, M., et al., *Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(3): p. 490-526.
87. Garey, K.W., et al., *Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(1): p. 25-31.
88. Schueller, G., et al., *Pulmonary infections in the late period after allogeneic bone marrow transplantation: chest radiography versus computed tomography*. Eur J Radiol, 2005. **53**(3): p. 489-94.
89. Lee, Y.R., et al., *CT halo sign: the spectrum of pulmonary diseases*. Br J Radiol, 2005. **78**(933): p. 862-5.
90. Greene, R.E., et al., *Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(3): p. 373-9.
91. Aribandi, M., V.A. McCoy, and C. Bazan, 3rd, *Imaging features of invasive and noninvasive fungal sinusitis: a review*. Radiographics, 2007. **27**(5): p. 1283-96.
92. Tempkin, A.D., et al., *Cerebral aspergillosis: radiologic and pathologic findings*. Radiographics, 2006. **26**(4): p. 1239-42.
93. Brenner, D.J. and E.J. Hall, *Computed tomography--an increasing source of radiation exposure*. N Engl J Med, 2007. **357**(22): p. 2277-84.
94. Burgos, A., et al., *Pediatric invasive aspergillosis: a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases*. Pediatrics, 2008. **121**(5): p. e1286-94.
95. Mikulska, M., et al., *The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia*. Crit Care, 2010. **14**(6): p. R222.
96. Morrissey, C.O., et al., *Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial*. Lancet Infect Dis, 2013. **13**(6): p. 519-28.
97. Tobon, A.M., et al., *Disseminated histoplasmosis: a comparative study between patients with acquired immunodeficiency syndrome and non-human immunodeficiency virus-infected individuals*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **73**(3): p. 576-82.
98. Khot, P.D. and D.N. Fredricks, *PCR-based diagnosis of human fungal infections*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009. **7**(10): p. 1201-21.
99. Lau, A., et al., *Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(3): p. 811-6.
100. Taira, C.L., et al., *A multiplex nested PCR for the detection and identification of Candida species in blood samples of critically ill paediatric patients*. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 406.
101. Nabili, M., et al., *Detection of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients using real-time PCR*. J Glob Infect Dis, 2013. **5**(2): p. 68-75.
102. Morjaria, S., et al., *Ribosomal RNA gene sequencing for early diagnosis of Blastomyces dermatitidis infection*. Int J Infect Dis, 2015. **37**: p. 122-4.
103. Jeng, K., et al., *Comparative analysis of two broad-range PCR assays for pathogen detection in positive-blood-culture bottles: PCR-high-resolution melting analysis versus PCR-mass spectrometry*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(10): p. 3287-92.
104. Massire, C., et al., *PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry for broad-range identification of fungal pathogens*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(3): p. 959-66.
105. Walsh, T.J., et al., *Molecular detection and species-specific identification of medically important Aspergillus species by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(12): p. 4150-7.
106. Buchheidt, D., et al., *Prospective clinical evaluation of a LightCycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients*. Br J Haematol, 2004. **125**(2): p. 196-202.

107. Lass-Flörl, C., et al., *Diagnosing invasive aspergillosis during antifungal therapy by PCR analysis of blood samples*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(9): p. 4154-7.
108. Mirhendi, H., et al., *A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important Candida species*. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi, 2006. **47**(3): p. 225-9.
109. Maaroufi, Y., et al., *Rapid detection of Candida albicans in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3293-8.
110. Spiess, B., et al., *Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of Aspergillus fumigatus DNA in clinical samples from neutropenic patients*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(5): p. 1811-8.
111. Klingspor, L. and S. Jalal, *Molecular detection and identification of Candida and Aspergillus spp. from clinical samples using real-time PCR*. Clin Microbiol Infect, 2006. **12**(8): p. 745-53.
112. Schabereiter-Gurtner, C., et al., *Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important Aspergillus and Candida species in clinical specimens*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(3): p. 906-14.
113. Loeffler, J., et al., *Analytical Comparison of In Vitro-Spiked Human Serum and Plasma for PCR-Based Detection of Aspergillus fumigatus DNA: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(9): p. 2838-45.
114. Guo, S. and J.K. Bhattacharjee, *Novel lysine biosynthetic gene sequences (LYS1 and LYS5) used as PCR targets for the detection of the pathogenic Candida yeast*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **72**(2): p. 416-20.
115. Costa, C., et al., *Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating Aspergillus fumigatus DNA in serum*. J Microbiol Methods, 2001. **44**(3): p. 263-9.
116. *World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects*. J Am Coll Dent, 2014. **81**(3): p. 14-8.
117. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
118. Zipper, H., et al., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(12): p. e103.
119. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
120. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
121. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(22): p. 4673-80.
122. Carbone, I. and L.M. Kohn, *A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes*. Mycologia, 1999: p. 553-556.
123. Aveskamp, M.M., et al., *DNA phylogeny reveals polyphyly of Phoma section Peyronellaea and multiple taxonomic novelties*. Mycologia, 2009. **101**(3): p. 363-82.
124. James, T.Y., et al., *Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 818.
125. Hudspeth, M.E., W.E. Timberlake, and R.B. Goldberg, *DNA sequence organization in the water mold Achlya*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(10): p. 4332-6.
126. Garber, R.C., et al., *Organization of ribosomal RNA genes in the fungus Cochliobolus heterostrophus*. Curr Genet, 1988. **14**(6): p. 573-82.
127. Bruns, T.D., T.J. White, and J.W. Taylor, *Fungal molecular systematics*. Annual Review of Ecology and systematics, 1991. **22**(1): p. 525-564.
128. Schoch, C.L., et al., *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(16): p. 6241-6.

129. Kobayashi, T., et al., *Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in Saccharomyces cerevisiae: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I*. Genes Dev, 1998. **12**(24): p. 3821-30.
130. Herrera, M.L., et al., *Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA Copy numbers in Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(5): p. 1325-32.
131. Corless, C.E., et al., *Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(5): p. 1747-52.
132. Barns, S.M., et al., *Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1609-13.
133. Kobayashi, T., *Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(8): p. 1395-403.
134. Giovannoni, S.J., et al., *Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton*. Nature, 1990. **345**(6270): p. 60-3.
135. Isenbarger, T.A., et al., *The most conserved genome segments for life detection on Earth and other planets*. Origins of Life and Evolution of Biospheres, 2008. **38**(6): p. 517-533.
136. Fox, G.E., et al., *The phylogeny of prokaryotes*. Science, 1980. **209**(4455): p. 457-63.
137. Akone, S.H., et al., *2-Pentenedioic acid derivatives from a soil-derived fungus Gongronella butleri*. Phytochemistry Letters, 2014. **10**: p. 184-188.
138. Crick, F.H., *Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis*. J Mol Biol, 1966. **19**(2): p. 548-55.
139. Henrich, B., et al., *Mycoplasma salivarium as a dominant coloniser of Fanconi anaemia associated oral carcinoma*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92297.
140. Liu, D., *Molecular detection of human fungal pathogens*. 2011: CRC Press.
141. Galperin, M.Y. and E.V. Koonin, *Who's your neighbor? New computational approaches for functional genomics*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(6): p. 609-13.
142. Schnoes, A.M., et al., *Annotation error in public databases: misannotation of molecular function in enzyme superfamilies*. PLoS Comput Biol, 2009. **5**(12): p. e1000605.
143. Rüschemdorf, A., *Medizinische Mykologie: Bestimmung und Differenzierung von Sprosspilzen, Schimmelpilzen, Dermatophyten und dimorphen Pilzen*. 2014: Lehmanns Media.
144. Guarro, J., GeneJ, and A.M. Stchigel, *Developments in fungal taxonomy*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(3): p. 454-500.
145. Grafenhan, T., et al., *An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in Cosmospora, Acremonium, Fusarium, Stilbella, and Volutella*. Stud Mycol, 2011. **68**: p. 79-113.
146. Zhang, X. and W. Zhuang, *Phylogeny of some genera in the Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes) inferred from 28S nrDNA partial sequences*. Mycosystema, 2005. **25**(1): p. 15-22.
147. Liu, X.-Z., et al., *Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes*. Stud Mycol, 2015. **81**: p. 85-147.
148. Kurtzman, C.P., C.J. Robnett, and E. Basehoar-Powers, *Phylogenetic relationships among species of Pichia, Issatchenkia and Williopsis determined from multigene sequence analysis, and the proposal of Barnettozyma gen. nov., Lindnera gen. nov. and Wickerhamomyces gen. nov.* FEMS yeast research, 2008. **8**(6): p. 939-954.
149. Hawksworth, D.L., *Mycological Research News IN THIS ISSUE*. Mycol Res, 2003. **107**(6): p. 641-642.
150. Further, T., *Mycological Research News*. Mycol Res, 2009. **113**: p. 275-278.
151. Holland, B.R., D. Penny, and M.D. Hendy, *Outgroup misplacement and phylogenetic inaccuracy under a molecular clock--a simulation study*. Syst Biol, 2003. **52**(2): p. 229-38.
152. Shavit, L., et al., *The problem of rooting rapid radiations*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(11): p. 2400-11.

153. Innis, M.A., et al., *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 2012: Academic press.
154. Rodriguez, A., et al., *Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1275**: p. 31-56.
155. Dieffenbach, C.W., T.M. Lowe, and G.S. Dveksler, *General concepts for PCR primer design*. *PCR Methods Appl*, 1993. **3**(3): p. S30-7.
156. Sheffield, V.C., et al., *Attachment of a 40-base-pair G+ C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989. **86**(1): p. 232-236.
157. Abrams, E.S., S.E. Murdaugh, and L.S. Lerman, *Comprehensive detection of single base changes in human genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis and a GC clamp*. *Genomics*, 1990. **7**(4): p. 463-475.
158. Koressaar, T. and M. Remm, *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*. *Bioinformatics*, 2007. **23**(10): p. 1289-91.
159. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
160. Rao, X., et al., *An improvement of the 2<sup>-delta delta CT</sup> method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. *Biostat Bioinforma Biomath*, 2013. **3**(3): p. 71-85.
161. Chamilos, G., R.E. Lewis, and D.P. Kontoyiannis, *Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis*. *Clin Infect Dis*, 2008. **47**(4): p. 503-9.
162. Guo, Y., J.X. Yang, and G.W. Liang, *A Real-Time PCR Assay Based on 5.8S rRNA Gene (5.8S rDNA) for Rapid Detection of Candida from Whole Blood Samples*. *Mycopathologia*, 2016. **181**(5-6): p. 405-13.
163. White, P.L., et al., *Evaluation of Aspergillus PCR protocols for testing serum specimens*. *J Clin Microbiol*, 2011. **49**(11): p. 3842-8.
164. Springer, J., et al., *Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of Aspergillus DNA in high-risk hematological patients*. *J Clin Microbiol*, 2013. **51**(5): p. 1445-50.
165. Loeffler, J., et al., *Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(2): p. 586-90.
166. Williams, D.W., et al., *Identification of Candida species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA*. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(9): p. 2476-9.
167. Lau, A., et al., *Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens*. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(2): p. 380-5.
168. Zhang, B. and M. Izadjoo, *Differential Diagnosis of Candida Species With Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Temperature Analyses (RTPCR-MTA)*. *Mil Med*, 2015. **180**(6): p. 652-9.
169. Heng, S.C., et al., *Clinical utility of Aspergillus galactomannan and PCR in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014. **79**(3): p. 322-7.
170. Boch, T., et al., *Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1,3-beta-D-glucan, Aspergillus PCR, multifungal DNA-microarray, and Aspergillus azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples: results of a prospective multicentre study*. *Clin Microbiol Infect*, 2016. **22**(10): p. 862-868.
171. Arendrup, M.C., *Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology*. *Dan Med J*, 2013. **60**(11): p. B4698.



172. Zhang, J., et al., *Development of Candida-Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important Candida Species*. Microbiol Insights, 2016. **9**: p. 21-8.
173. Ashrafi, M., et al., *A real time PCR assay on blood for diagnosis of invasive candidiasis in immunocompromised patient*. Curr Med Mycol, 2015. **1**(1): p. 35-41.
174. Walsh, T.J., et al., *Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(3): p. 327-60.
175. Nucci, F., et al., *Fusariosis*. Semin Respir Crit Care Med, 2015. **36**(5): p. 706-14.
176. Ozhak-Baysan, B., et al., *Aspergillus alliaceus and Aspergillus flavus co-infection in an acute myeloid leukemia patient*. Med Mycol, 2010. **48**(7): p. 995-9.
177. Amirrajab, N., et al., *Co-infection of invasive pulmonary aspergillosis and cutaneous Fusarium infection in a patient with pyoderma gangrenosum*. J Res Med Sci, 2015. **20**(2): p. 199-203.
178. Ponces Bento, D., et al., *Unusual coexistence of opportunistic lung infections in a human immunodeficiency virus positive patient suffering from persistent Pneumocystis jirovecii pneumonia: a case report*. Rev Port Pneumol, 2013. **19**(3): p. 129-33.
179. Vaidya, D. and P. Shah, *Coinfection by Aspergillus and Zygomycetes Species in a Case of Acute Rhinosinusitis*. Case Rep Otolaryngol, 2011. **2011**.
180. Lass-Flörl, C., et al., *Utility of PCR in diagnosis of invasive fungal infections: real-life data from a multicenter study*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(3): p. 863-8.
181. Neville, B.A., C. d'Enfert, and M.E. Bougnoux, *Candida albicans commensalism in the gastrointestinal tract*. FEMS Yeast Res, 2015. **15**(7).
182. Leroy, O., et al., *Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006)*. Crit Care Med, 2009. **37**(5): p. 1612-8.
183. Sipsas, N.V., et al., *Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection*. Cancer, 2009. **115**(20): p. 4745-52.
184. Schnabel, R.M., et al., *Candida Pneumonia in Intensive Care Unit?* Open Forum Infect Dis, 2014. **1**(1).
185. Horn, D.L., et al., *Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(12): p. 1695-703.
186. Pagano, L., et al., *The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study*. Haematologica, 2006. **91**(8): p. 1068-75.
187. Pittet, D., et al., *Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients*. Ann Surg, 1994. **220**(6): p. 751-8.
188. Viale, P., *Candida colonization and candiduria in critically ill patients in the intensive care unit*. Drugs, 2009. **69 Suppl 1**: p. 51-7.
189. Barnes, R.A., *Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61 Suppl 1**: p. i3-6.
190. White, P.L., et al., *Aspergillus PCR: one step closer to standardization*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1231-1240.
191. Guarner, J. and M.E. Brandt, *Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(2): p. 247-80.
192. Stergiopoulou, T., et al., *Host-dependent patterns of tissue injury in invasive pulmonary aspergillosis*. Am J Clin Pathol, 2007. **127**(3): p. 349-55.
193. Hopfer, R.L., *Contemporary techniques for molecular diagnoses of mycoses*. Clinical Microbiology Newsletter, 1997. **19**(22): p. 169-173.
194. Loeffler, J., et al., *Polymerase chain reaction detection of aspergillus DNA in experimental models of invasive aspergillosis*. J Infect Dis, 2002. **185**(8): p. 1203-6.
195. Shah, A.A. and K.C. Hazen, *Diagnostic accuracy of histopathologic and cytopathologic examination of Aspergillus species*. Am J Clin Pathol, 2013. **139**(1): p. 55-61.

196. Tarrand, J.J., et al., *Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination.* Am J Clin Pathol, 2003. **119**(6): p. 854-8.
197. Alonso, M., et al., *Rapid detection and identification of Aspergillus from lower respiratory tract specimens by use of a combined probe-high-resolution melting analysis.* J Clin Microbiol, 2012. **50**(10): p. 3238-43.
198. Fairs, A., et al., *Isolation of Aspergillus fumigatus from sputum is associated with elevated airborne levels in homes of patients with asthma.* Indoor Air, 2013. **23**(4): p. 275-84.
199. Shin, J.H., et al., *Detection, identification, and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry.* J Clin Microbiol, 2013. **51**(1): p. 136-41.
200. Loeffler, J., et al., *Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of Aspergillus DNA by PCR.* J Clin Microbiol, 2000. **38**(10): p. 3830-3.
201. Mengoli, C., et al., *Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis.* Lancet Infect Dis, 2009. **9**(2): p. 89-96.
202. Springer, J., et al., *Comparison of Performance Characteristics of Aspergillus PCR in Testing a Range of Blood-Based Samples in Accordance with International Methodological Recommendations.* J Clin Microbiol, 2016. **54**(3): p. 705-11.
203. Chitasombat, M. and K. Supparatpinyo, *Penicillium marneffeii Infection in Immunocompromised Host.* Curr Fungal Infect Rep, 2013. **7**(1): p. 44-50.
204. Walsh, T.J., et al., *Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens.* Clinical Microbiology and Infection, 2004. **10**: p. 48-66.
205. Ruangritchankul, K., et al., *Invasive fungal disease in university hospital: a PCR-based study of autopsy cases.* Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(11): p. 14840-52.
206. Dignani, M.C., *Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports.* F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 81.
207. Musa, M.O., et al., *The spectrum of Fusarium infection in immunocompromised patients with haematological malignancies and in non-immunocompromised patients: a single institution experience over 10 years.* Br J Haematol, 2000. **108**(3): p. 544-8.
208. van Diepeningen, A.D., et al., *Diagnosis of Fusarium Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory.* Curr Fungal Infect Rep, 2015. **9**(3): p. 135-43.
209. Ahmad, S., Z.U. Khan, and A.M. Theyyathel, *Development of a nested PCR assay for the detection of Fusarium solani DNA and its evaluation in the diagnosis of invasive fusariosis using an experimental mouse model.* Mycoses, 2010. **53**(1): p. 40-7.
210. Bernal-Martinez, L., et al., *Detection of invasive infection caused by Fusarium solani and non-Fusarium solani species using a duplex quantitative PCR-based assay in a murine model of fusariosis.* Med Mycol, 2012. **50**(3): p. 270-5.
211. Khan, Z.U., S. Ahmad, and A.M. Theyyathel, *Diagnostic value of DNA and (1-->3)- beta-D-glucan detection in serum and bronchoalveolar lavage of mice experimentally infected with Fusarium oxysporum.* J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 1): p. 36-42.
212. Noorifard, M., et al., *Epidemiology and clinical manifestation of fungal infection related to Mucormycosis in hematologic malignancies.* J Med Life, 2015. **8**(Spec Iss 2): p. 32-37.
213. Petrikkos, G., et al., *Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis.* Clin Infect Dis, 2012. **54 Suppl 1**: p. S23-34.
214. Chamilos, G., et al., *Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003).* Haematologica, 2006. **91**(7): p. 986-9.
215. Kume, H., et al., *Increase in aspergillosis and severe mycotic infection in patients with leukemia and MDS: comparison of the data from the Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan in 1989, 1993 and 1997.* Pathol Int, 2003. **53**(11): p. 744-50.
216. Hoffmann, K., et al., *The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies.* Persoonia, 2013. **30**: p. 57-76.

217. Ziaee, A., et al., *Molecular Identification of Mucor and Lichtheimia Species in Pure Cultures of Zygomycetes*. Jundishapur J Microbiol, 2016. **9**(4).
218. Guinea, J., et al., *Increasing incidence of mucormycosis in a large Spanish hospital from 2007 to 2015: Epidemiology and microbiological characterization of the isolates*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0179136.
219. Bialek, R. and U.E. Zelck, *[PCR-based diagnosis of mucormycosis in tissue samples]*. Pathologie, 2013. **34**(6): p. 511-8.
220. Kobayashi, M., et al., *Molecular polymerase chain reaction diagnosis of pulmonary mucormycosis caused by Cunninghamella bertholletiae*. Respirology, 2004. **9**(3): p. 397-401.
221. Bialek, R., et al., *PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue*. J Clin Pathol, 2005. **58**(11): p. 1180-4.
222. de Almeida Junior, J.N. and C. Hennequin, *Invasive Trichosporon Infection: a Systematic Review on a Re-emerging Fungal Pathogen*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1629.
223. Nakajima, M., T. Sugita, and Y. Mikami, *Granuloma associated with Trichosporon asahii infection in the lung: Unusual pathological findings and PCR detection of Trichosporon DNA*. Med Mycol, 2007. **45**(7): p. 641-4.
224. Sano, M., et al., *Supplemental utility of nested PCR for the pathological diagnosis of disseminated trichosporonosis*. Virchows Arch, 2007. **451**(5): p. 929-35.
225. Nagai, H., et al., *PCR detection of DNA specific for Trichosporon species in serum of patients with disseminated trichosporonosis*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(3): p. 694-9.
226. Colombo, A.L., A.C.B. Padovan, and G.M. Chaves, *Current Knowledge of Trichosporon spp. and Trichosporonosis*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(4): p. 682-700.
227. Gago, S., et al., *A multiplex real-time PCR assay for identification of Pneumocystis jirovecii, Histoplasma capsulatum, and Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii in samples from AIDS patients with opportunistic pneumonia*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(4): p. 1168-76.
228. Tsujisaki, R.A., et al., *First molecular typing of cryptococcemia-causing cryptococcus in central-west Brazil*. Mycopathologia, 2013. **176**(3-4): p. 267-72.
229. Yamakawa, H., et al., *Correlation between clinical characteristics and chest computed tomography findings of pulmonary cryptococcosis*. Pulm Med, 2015. **2015**: p. 703407.
230. Patel, S., et al., *Oral Cryptococcosis in a Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia*. Int J Infect Dis, 2016. **50**: p. 18-20.
231. Wang, R.Y., et al., *Cryptococcosis in patients with hematological diseases: a 14-year retrospective clinical analysis in a Chinese tertiary hospital*. BMC Infect Dis, 2017. **17**(1): p. 463.
232. Lewis, R.E., et al., *Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study*. Mycoses, 2013. **56**(6): p. 638-45.
233. Neofytos, D., et al., *Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(3): p. 265-73.
234. Rivera, V., et al., *Validation and clinical application of a molecular method for the identification of Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii complex DNA in human clinical specimens*. Braz J Infect Dis, 2015. **19**(6): p. 563-70.
235. Qureshi, A., et al., *Detection of antibody against fungal glucosylceramide in immunocompromised patients: a potential new diagnostic approach for cryptococcosis*. Mycopathologia, 2012. **173**(5-6): p. 419-25.
236. Yeo, S.F. and B. Wong, *Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(3): p. 465-84.
237. Martins Mdos, A., et al., *Molecular diagnosis of cryptococcal meningitis in cerebrospinal fluid: comparison of primer sets for Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii species complex*. Braz J Infect Dis, 2015. **19**(1): p. 62-7.

238. Kumari, S., et al., *Comparison of Antigen Detection and Nested PCR in CSF Samples of HIV Positive and Negative Patients with Suspected Cryptococcal Meningitis in a Tertiary Care Hospital*. J Clin Diagn Res, 2016. **10**(4): p. DC12-5.
239. Viviani, M.A., et al., *Molecular analysis of 311 Cryptococcus neoformans isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(4): p. 614-9.
240. Stielow, J.B., et al., *One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes*. Persoonia, 2015. **35**: p. 242-63.
241. Tanabe, A.S. and H. Toju, *Two new computational methods for universal DNA barcoding: a benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76910.
242. White, T.J., et al., *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR protocols: a guide to methods and applications, 1990. **18**: p. 315-322.
243. Ogawa, M., et al., *Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012. **250**(12): p. 1877-83.
244. Evertsson, U., H.J. Monstein, and A.G. Johansson, *Detection and identification of fungi in blood using broad-range 28S rDNA PCR amplification and species-specific hybridisation*. APMIS, 2000. **108**(5): p. 385-92.
245. Varkey, J.B. and J.R. Perfect, *Rare and emerging fungal pulmonary infections*. Semin Respir Crit Care Med, 2008. **29**(2): p. 121-31.
246. Boyce, R.D., et al., *Phaeohyphomycosis due to Alternaria species in transplant recipients*. Transpl Infect Dis, 2010. **12**(3): p. 242-50.
247. Jahagirdar, B.N. and V.A. Morrison, *Emerging fungal pathogens in patients with hematologic malignancies and marrow/stem-cell transplant recipients*. Semin Respir Infect, 2002. **17**(2): p. 113-20.
248. Pastor, F.J. and J. Guarro, *Alternaria infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(8): p. 734-46.
249. Radio, S.J., et al., *Cytomorphology of Alternaria in bronchoalveolar lavage specimens*. Acta Cytol, 1987. **31**(3): p. 243-8.
250. Secnikova, Z., et al., *The rare case of Alternaria alternata cutaneous and pulmonary infection in a heart transplant recipient treated by azole antifungals*. Dermatol Ther, 2014. **27**(3): p. 140-3.
251. Castro, A.S., A. Oliveira, and V. Lopes, *Pulmonary phaeohyphomycosis: a challenge to the clinician*. Eur Respir Rev, 2013. **22**(128): p. 187-8.
252. Denning, D.W., *Invasive aspergillosis*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(4): p. 781-803; quiz 804-5.
253. Sautour, M., et al., *A prospective survey of air and surface fungal contamination in a medical mycology laboratory at a tertiary care university hospital*. Am J Infect Control, 2009. **37**(3): p. 189-94.
254. Garg, N., et al., *Central nervous system cladosporiosis: an account of ten culture-proven cases*. Neurol India, 2007. **55**(3): p. 282-8.
255. Groll, A.H. and T.J. Walsh, *Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats*. Clin Microbiol Infect, 2001. **7 Suppl 2**: p. 8-24.
256. Safdar, A., *Progressive cutaneous hyalohyphomycosis due to Paecilomyces lilacinus: rapid response to treatment with caspofungin and itraconazole*. Clin Infect Dis, 2002. **34**(10): p. 1415-7.
257. Ghajari, A., et al., *Fungal Airborne Contamination as a Serious Threat for Respiratory Infection in the Hematology Ward*. Tanaffos, 2015. **14**(4): p. 257-61.
258. Kantarcioglu, A.S., A. Yucel, and G.S. de Hoog, *Case report. Isolation of Cladosporium cladosporioides from cerebrospinal fluid*. Mycoses, 2002. **45**(11-12): p. 500-3.
259. Katotomichelakis, M., et al., *Alternaria and Cladosporium calendar of Western Thrace: Relationship with allergic rhinitis symptoms*. Laryngoscope, 2015.
260. Chowdhary, A., et al., *Allergic bronchopulmonary mycosis due to fungi other than Aspergillus: a global overview*. Crit Rev Microbiol, 2014. **40**(1): p. 30-48.

261. Weber, R.W., *Species of Cladosporium*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. **89**(6): p. A-6.
262. Safdar, A., S. Singhal, and J. Mehta, *Clinical significance of non-Candida fungal blood isolation in patients undergoing high-risk allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (1993-2001)*. Cancer, 2004. **100**(11): p. 2456-61.
263. Tortorano, A.M., et al., *Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of Fusarium spp. from northern Italy*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(7): p. 2683-5.
264. Lass-Flörl, C., et al., *Clinical evaluation of Aspergillus-PCR for detection of invasive aspergillosis in immunosuppressed patients*. Mycoses, 2005. **48 Suppl 1**: p. 12-7.
265. Reinwald, M., et al., *Therapy with antifungals decreases the diagnostic performance of PCR for diagnosing invasive aspergillosis in bronchoalveolar lavage samples of patients with haematological malignancies*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(9): p. 2260-7.
266. Springer, J., H. Einsele, and J. Loeffler, *Molecular techniques in the diagnosis of deep and systemic mycosis*. Clin Dermatol, 2012. **30**(6): p. 651-6.
267. Lass-Flörl, C., et al., *Screening for Aspergillus spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies*. Br J Haematol, 2001. **113**(1): p. 180-4.
268. Bernal-Martinez, L., et al., *Analysis of performance of a PCR-based assay to detect DNA of Aspergillus fumigatus in whole blood and serum: a comparative study with clinical samples*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(10): p. 3596-9.
269. Suarez, F., et al., *Detection of circulating Aspergillus fumigatus DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(11): p. 3772-7.
270. Park, B.J., et al., *Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS*. AIDS, 2009. **23**(4): p. 525-530.
271. Tlamcani, Z., *Cryptococcosis infection among HIV patients*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2016. **6**(6): p. 489-491.
272. Tasaka, S. and H. Tokuda, *Recent advances in the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in HIV-infected adults*. Expert Opin Med Diagn, 2013. **7**(1): p. 85-97.
273. Roux, A., et al., *Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with or without AIDS, France*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(9): p. 1490-7.
274. Cordonnier, C., et al., *Pneumocystis jirovecii pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. **71**(9): p. 2379-2385.
275. Maschmeyer, G., et al., *ECIL guidelines for treatment of Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV-infected haematology patients*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. **71**(9): p. 2405-2413.
276. Metwally, L., et al., *Comparison of serum and whole-blood specimens for the detection of Candida DNA in critically ill, non-neutropenic patients*. J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 10): p. 1269-72.
277. Maaroufi, Y., et al., *Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered Candida species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 3159-63.
278. White, P.L., et al., *Critical stages of extracting DNA from Aspergillus fumigatus in whole-blood specimens*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(10): p. 3753-5.

## 8 ANHANG

### 8.1 rDNA-Sequenzen zum Design von fuPCR-Primern

Auflistung der 1521 gesammelten Sequenzen des ITS1, 5.8S und ITS2 Sequenzabschnittes.

**Tabelle 27:** ACC-Nummern der verwendeten Sequenzdaten.

<b>Absidia</b>		<b>13</b> JX501769	<b>34</b> JX456205	<b>39</b> JX092088
<b>#</b> <b>A. caerulea</b>	<b>#</b> <b>A. spinosa</b>	<b>1</b> AY944886	<b>35</b> KC131548	<b>40</b> JX174055
<b>1</b> AJ878505	<b>1</b> AY944887	<b>2</b> AY944888	<b>#</b> <b>A. fumigatus</b>	<b>41</b> JX501386
<b>2</b> AY944866	<b>3</b> AY944888		<b>1</b> AB250391	<b>42</b> KC119199
<b>3</b> AY944867			<b>2</b> AB265145	<b>43</b> KC119200
<b>4</b> AY944868			<b>3</b> AF109328	<b>44</b> FJ765414
<b>5</b> AY944871			<b>4</b> AF138288	<b>45</b> GU004291
<b>6</b> EU709778	<b>Aspergillus</b>		<b>5</b> AF455431	<b>46</b> GU183175
<b>7</b> FJ444943	<b>#</b> <b>A. flavus</b>		<b>6</b> AY214446	<b>#</b> <b>A. lentulus</b>
<b>8</b> HQ285621	<b>1</b> AJ876522		<b>7</b> AY214448	<b>1</b> AB299412
<b>9</b> JX661056	<b>2</b> EF567959		<b>8</b> AY373851	<b>2</b> AY738524
<b>10</b> JX661057	<b>3</b> EF661547		<b>9</b> DQ459328	<b>3</b> EF669970
<b>11</b> JX661058	<b>4</b> EF661552		<b>10</b> DQ981399	<b>4</b> FR839681
<b>#</b> <b>A. glauca</b>	<b>5</b> EF661566		<b>11</b> EF134624	<b>5</b> HE578064
<b>1</b> AJ876491	<b>6</b> GQ370372		<b>12</b> EF634384	<b>#</b> <b>A. nidulans</b>
<b>2</b> AJ877961	<b>7</b> GU004292		<b>13</b> EF634403	<b>1</b> AB243115
<b>3</b> AJ878506	<b>8</b> GU815344		<b>14</b> EF669999	<b>2</b> AB248971
<b>4</b> AY944875	<b>9</b> GU966494		<b>15</b> EU256469	<b>3</b> AF138289
<b>5</b> AY944879	<b>10</b> HE608164		<b>16</b> FJ227888	<b>4</b> AF455424
<b>6</b> AY944880	<b>11</b> HF548688		<b>17</b> FJ227893	<b>5</b> AJ937756
<b>7</b> EU484272	<b>12</b> HM016904		<b>18</b> FJ499434	<b>6</b> AM158202
<b>8</b> EU484295	<b>13</b> HM167493		<b>19</b> FJ810502	<b>7</b> AY373888
<b>9</b> FJ861373	<b>14</b> HM178946		<b>20</b> FJ878717	<b>8</b> EF136364
<b>10</b> FJ861374	<b>15</b> HM222933		<b>21</b> FM999057	<b>9</b> EF567973
<b>11</b> HM776406	<b>16</b> HQ340106		<b>22</b> FM999058	<b>10</b> EF652427
<b>12</b> HQ285606	<b>17</b> HQ340107		<b>23</b> GQ169469	<b>11</b> EU287942
<b>13</b> JN942680	<b>18</b> HQ395774		<b>24</b> GQ461908	<b>12</b> FJ791144
<b>14</b> JQ918155	<b>19</b> HQ607957		<b>25</b> GU291254	<b>13</b> FJ878641
<b>#</b> <b>A. repens</b>	<b>20</b> HQ844703		<b>26</b> GU566217	<b>14</b> FJ878645
<b>1</b> AJ877962	<b>21</b> HQ844707		<b>27</b> GU566242	<b>15</b> GQ461904
<b>2</b> AY944890	<b>22</b> HQ844711		<b>28</b> GU982937	<b>16</b> GU205096
<b>3</b> EF030527	<b>23</b> HQ844713		<b>29</b> HQ026746	<b>17</b> HQ285615
<b>4</b> EF030528	<b>24</b> HQ844714		<b>30</b> HQ285554	<b>18</b> HQ674655
<b>5</b> EU484281	<b>25</b> HQ844715		<b>31</b> HQ589139	<b>19</b> JN561268
<b>6</b> EU484288	<b>26</b> HQ844716		<b>32</b> HQ589141	<b>20</b> JN672587
<b>7</b> FJ849793	<b>27</b> JF412782		<b>33</b> HQ844676	<b>21</b> JQ796874
<b>8</b> JN942685	<b>28</b> JF412783		<b>34</b> JF729022	<b>#</b> <b>A. niger</b>
<b>9</b> JQ683216	<b>29</b> JF951750		<b>35</b> JN942916	<b>1</b> AY373852
<b>10</b> JQ683217	<b>30</b> JN850985		<b>36</b> JN943566	<b>2</b> DQ834378
<b>11</b> JQ683218	<b>31</b> JQ029689		<b>37</b> JQ046374	<b>3</b> EF634376
<b>12</b> JQ683219	<b>32</b> JQ316528		<b>38</b> JQ767180	<b>4</b> EU543987
	<b>33</b> JX232269			<b>5</b> GQ130305

Tabelle 27: ACC-Nummern der verwendeten Sequenzdaten. (Fortsetzung)

6	GQ229071	26	JQ612479	20	FR837962	68	JX518270
7	GQ229076	27	JQ697553	21	FR837966	69	JX863372
8	GQ229077	28	JQ717325	22	FR837967	70	JX863373
9	GQ890276	29	JQ717336	23	GQ338244	#	<b>A. tuingensis</b>
10	GU134885	30	JQ762255	24	GQ342626	1	AJ280007
11	HM061131	31	JX110980	25	GQ461911	2	EU867248
12	HQ014696	32	JX429926	26	GU004293	3	FJ960824
13	HQ285563	33	JX878609	27	GU256759	4	FR727128
14	HQ392477	34	KC341712	28	GU362937	5	FR727132
15	JF436885	#	<b>A. parasiticus</b>	29	GU564263	6	GU325670
16	JF838357	1	AB008418	30	GU594775	7	GU595290
17	JN561269	2	AB074995	31	GU594776	8	HM016892
18	JQ316523	3	AF027862	32	GU966497	9	HM776413
19	JQ693403	4	AY373859	33	HF546375	10	HQ905466
20	JQ764805	5	DQ026005	34	HQ014693	11	JN126255
21	JX291201	6	DQ467988	35	HQ219673	12	JN217235
22	JX501365	7	EF661555	36	HQ608043	13	JN585941
23	JX523614	8	EF661557	37	JF431429	14	JN851058
24	JX535496	9	EF661568	38	JF681300	15	JQ316524
25	JX556221	10	EU982020	39	JF834065	16	JQ316525
26	KC119204	11	EU982021	40	JF921982	17	JQ675306
27	KC341973	12	GU953212	41	JF921983	18	JQ693399
#	<b>A. oryzae</b>	13	HM560044	42	JN129182	19	JX291176
1	AF027863	14	HQ285604	43	JN198425	20	JX291180
2	AF459735	15	HQ340110	44	JN831365	21	JX291185
3	AY373857	16	JF412785	45	JN851053	22	JX291196
4	EF136362	17	JN942865	46	JN974768	23	JX501380
5	EF151428	18	JQ316518	47	JQ070071	24	JX501396
6	EF591304	#	<b>A. terreus</b>	48	JQ361749	25	JX501398
7	EF634406	1	AB647191	49	JQ387729	26	JX501413
8	EF661560	2	AF078897	50	JQ697511	27	JX869553
9	EU409799	3	AJ001331	51	JQ697531	28	KC020122
10	EU409806	4	AJ001333	52	JQ697532	29	KC215133
11	FJ654483	5	AJ001368	53	JQ697545	#	<b>A. versicolor</b>
12	GU120193	6	AJ413985	54	JQ717327	1	AY373882
13	GU385811	7	AM262397	55	JQ717343	2	EF125026
14	GU966496	8	ASN58RRB	56	JQ724410	3	EU042148
15	HF546392	9	AY303606	57	JQ766524	4	EU326209
16	HM145964	10	AY303607	58	JQ812053	5	EU497952
17	HM441253	11	AY373871	59	JQ828931	6	EU833210
18	HM753601	12	AY822630	60	JQ867375	7	FJ878627
19	HQ285587	13	EF121338	61	JQ889709	8	FR733851
20	HQ285588	14	EF121339	62	JQ952675	9	FR733853
21	HQ607990	15	EF669579	63	JX188057	10	GQ229082
22	HQ710546	16	EF669586	64	JX290029	11	GU723436
23	JF461319	17	EF669598	65	JX501352	12	GU934602
24	JF899326	18	EU982024	66	JX501372	13	HF548691
25	JN662374	19	FJ878634	67	JX518254	14	HQ316559

Tabelle 27: ACC-Nummern der verwendeten Sequenzdaten. (Fortsetzung)

15	HQ637361	27	JN882319	6	EF568002	12	GQ152296
16	JF793526	28	JN882321	7	EU798700	13	JN167991
17	JF817276	29	JQ678820	8	FJ697172	14	JN391290
18	JF911763	30	JQ901930	9	FN394004	15	JN797502
19	JN252119	31	JX094781	10	GQ376080	16	JN797503
20	JN545818	32	JX463256	11	GQ376082	17	JN980100
21	JN689347	33	JX463265	12	GU199447	18	JN989496
22	JN798501	34	JX463266	13	HE993756	19	JN989501
23	JN851026	35	KC422406	14	HE993757	20	JN989502
24	JN851048	36	KC422434	15	HQ014735	21	JN989503
25	JN942862	#	<b>C. dubliniensis</b>	16	JN008128	22	JN989506
26	JN997427	1	AB369916	17	JN093145	23	JN989507
27	JQ724473	2	AJ249484	18	JN391274	24	JN989510
28	JQ809325	3	AJ249485	19	JQ070075	25	JN989511
29	JQ963339	4	AJ865081	20	JQ292918	26	JN989512
30	JX160053	5	AJ865083	21	KC408958	27	JQ585707
31	JX436463	6	AY939805	22	KC408964	28	JQ585709
32	JX845289	7	AY939809	#	<b>C. krusei</b>	29	JQ665420
33	KC339215	8	DQ231526	1	AB305095	30	JQ726603
		9	DQ231533	2	AB369918	31	JX111992
		10	DQ355938	3	AF246989	32	KC253985
		11	DQ355947	4	AY235807	#	<b>C. parapsilosis</b>
		12	EF032489	5	DQ674354	1	AF287909
		13	EF032494	6	EF198000	2	AY939798
		14	EF567997	7	EF568015	3	EF192217
		15	EF567999	8	FJ697171	4	EF197997
		16	FM178301	9	FM199972	5	EF568029
		17	FN652298	10	GQ254804	6	EU564198
		18	FR820640	11	HM771638	7	EU564206
		19	HE860429	12	JF715197	8	FJ662413
		20	HE860432	13	JQ726607	9	FJ662417
		21	HE860433	14	JQ808007	10	FJ872015
		22	HQ457427	15	KC329578	11	GQ280289
		23	HQ457428	16	KC886644	12	GQ280303
		24	HQ591465	17	KF277144	13	GQ395610
		25	HQ849549	18	KF646198	14	GU373657
		26	JN391273	#	<b>C. orthopsilosis</b>	15	HF545671
		27	JN638819	1	AY391846	16	HQ014724
		28	JQ070103	2	EU552495	17	HQ263346
		29	KC146361	3	EU557372	18	HQ398238
		30	KC408939	4	EU557373	19	JF508435
		31	KC422403	5	EU564208	20	JN391302
		#	<b>C. glabrata</b>	6	FJ515170	21	JN942631
		1	AF167993	7	FJ746066	22	JN989532
		2	AM492797	8	FJ872017	23	JN997459
		3	AY939793	9	FM178396	24	JQ665414
		4	AY939794	10	FM178399	25	JQ952735
		5	DQ242637	11	GQ152295	26	JQ963283









Tabelle 27: ACC-Nummern der verwendeten Sequenzdaten. (Fortsetzung)

26	JQ910936	2	AF455412	22	JN226973	24	HQ166470
27	JQ910940	3	AF455477	23	JN252103	25	HQ166621
28	JQ910945	4	AJ004813	24	JN368448	26	HQ732137
29	JQ910951	5	AM158213	25	JN650597	27	HQ732138
30	JQ912272	6	AY213672	26	JN861753	28	JN545825
31	JQ912278	7	AY360401	27	JQ670956	29	JX241661
32	JQ912279	8	DQ093692	28	JQ781735	30	JX869559
33	JQ951627	9	DQ132838	29	JQ781802	31	KC009804
34	JQ951628	10	DQ148950	30	JX091401	32	KC169942
35	JX036541	11	EU030337	31	JX091402	33	KC456325
36	KC200567	12	EU128609	32	JX091404	#	<b>P. funiculosum</b>
37	KC461927	13	EU436692	33	JX869565	1	GU183120
#	<b>P. chrysogenum</b>	14	FJ499454	34	KC354488	2	JN093266
1	AB479305	15	FR670309	35	KC456186	3	JN676119
2	AF455490	16	FR799456	36	KC456191	4	JN676124
3	AJ004812	17	GU183158	37	NR_077153	5	JN899377
4	AJ608949	18	HM061318	#	<b>P. decumbens</b>	6	JN942854
5	AM158205	19	HQ652873	1	AF033453	7	JQ670958
6	AM948960	20	HQ710540	2	AF034458	8	JQ717333
7	AY213669	21	JN582025	3	AM176726	9	JQ717348
8	AY371629	22	JQ422626	4	AY157490	10	JQ724396
9	AY373902	23	JQ781757	5	AY373909	11	JQ724449
10	DQ148949	24	JX217744	6	FJ004291	12	JQ724527
11	DQ249212	25	KC009818	7	JN986754	13	JX045839
12	DQ336710	26	KC167858	#	<b>P. expansum</b>	14	JX500735
13	DQ681329	27	KC292847	1	AB298711	15	KC013273
14	EU128598	#	<b>P. crustosum</b>	2	AB479309	#	<b>P. marneffeii</b>
15	EU128618	1	AF484409	3	AF033479	1	AB298957
16	EU146307	2	AY373907	4	AF455466	2	AB298962
17	EU833212	3	DQ778917	5	AJ005676	3	AB353909
18	EU862195	4	EF634401	6	AJ608953	4	AB353919
19	FJ004281	5	EU128603	7	AY373912	5	AJ853738
20	FJ467371	6	EU128607	8	AY818338	6	DQ399414
21	FJ791150	7	FJ228197	9	DQ267827	7	FJ009557
22	FR670322	8	FJ571469	10	DQ681322	8	FJ009565
23	GQ121159	9	FR670330	11	EU098122	9	FJ009566
24	GQ499107	10	GQ221150	12	EU128626	10	FJ456351
25	GQ499160	11	HM037943	13	EU872424	11	HM595497
26	GU134894	12	HM469424	14	FJ004274	12	HQ730088
27	HM371375	13	HQ225711	15	FJ008994	13	JN679219
28	HQ850903	14	HQ262521	16	FJ008997	14	JN679222
29	JF834167	15	HQ710544	17	FJ463031	15	JQ585632
30	JN561280	16	HQ850918	18	FJ491784	16	JQ910936
31	JQ422604	17	HQ850927	19	FJ861424	17	JQ910940
32	JX136730	18	JF508487	20	GU004268	18	JQ910945
33	KC009826	19	JF731265	21	GU134896	19	JQ910951
#	<b>P. commune</b>	20	JN226935	22	HQ166367	20	JQ912272
1	AF348419	21	JN226957	23	HQ166369	21	JQ912278





## 8.2 ITS1-ITS2-Sequenzen zur Erstellung des phylogenetischen Baums

*Absidia caerulea* (AY944867), *A. glauca* (JN942680), *A. repens* (JQ683216), *A. spinosa* (AY944888), *Aspergillus flavus* (HQ340107), *A. fumigatus* (AY214446), *A. lentulus* (HE578064), *A. nidulans* (EU287942), *A. niger* (HQ014696), *A. oryzae* (AY373857), *A. parasiticus* (AY373859), *A. terreus* (JX290029), *A. tubingensis* (JX501380), *A. versicolor* (EF125026), *Candida albicans* (AY939786), *C. dubliniensis* (AJ249484), *C. glabrata* (AY939793), *C. krusei* (AB369918), *C. orthopsilosis* (FJ515170), *C. parapsilosis* (GQ395610), *C. tropicalis* (GQ376071), *Cryptococcus adeliensis* (AF145328), *C. albidus* (JX174413), *C. curvatus* (EU266558), *C. gattii* (JN939487), *C. laurentii* (AY591353), *C. neoformans* (AJ876525), *C. neoformans* var. *grubii* (AJ876598), *C. neoformans* var. *neoformans* (AF444326), *C. uniguttulatus* (AF444302), *Cunninghamella bertholletiae* (JN205877), *C. elegans* (FJ792589), *Fusarium moniliforme* (JX914478), *F. oxysporum* (FJ478116), *Escherichia coli* (HM483393), *F. proliferatum* (EU151489), *F. solani* (JQ658429), *Lichtheimia corymbifera* (GU980967), *L. hyalospora* (GQ342893), *L. ramosa* (JN561273), *Mucor circinelloides* (DQ118990), *M. circinelloides* f. *circinelloides* (AY243943), *M. circinelloides* f. *lusitanicus* (FN650645), *M. hiemalis* (JQ912672), *M. racemosus* (EU798702), *Penicillium brevicompactum* (JN246028), *P. camemberti* (EU497946), *P. chrysogenum* (KC009826), *P. commune* (KC009818), *P. crustosum* (AY373907), *P. decumbens* (AY373909), *P. expansum* (AJ608953), *P. funiculosum* (JQ717348), *P. marneffeii* (AB353919), *Rhizomucor pusillus* (EF540757), *R. variabilis* (JF904893), *Rhizopus microsporus* (FJ810505), *R. microspores* var. *microsporus* (AY803933), *R. oryzae* (AY803928), *R. stolonifer* (DQ641318), *Scedosporium apiospermum* (GU966519), *S. boydii* (AY939802), *S. prolificans* (AB362936), *Trichosporon asahii* (AY055381), *T. asteroides* (NR\_073241), *T. cutaneum* (FJ943422), *T. dermatitis* (FJ943425), *T. inkin* (NR\_073243), *T. loubieri* (JN943738), *T. mucoides* (FJ515218), *T. mycotoxinivorans* (FJ416595), *T. ovoides* (AF444439).

## 8.3 Publikationen

Auflistung von Publikationen und Beschreibung der Beiträge des Doktoranden zum jeweiligen Manuskript.

**Rahn S**, Schuck A, Kondakci M, Haas R, Neuhausen N, Pfeffer K, Henrich B. *A novel comprehensive set of fungal Real time PCR assays (fuPCR) for the detection of fungi in immunocompromised haematological patients-A pilot study. Int J Med Microbiol. 2016 Dec;306(8):611-623.*

- Kultivierung von Pilzen zur Gewinnung von DNA.
- Entwicklung der fuPCR.
  - In silico-Analysen (multiple Sequenzalignments) und Primerdesign.
  - Durchführung der Realtime-PCRs für die Detektion von Pilz-DNA.
  - Auswertung der PCR-Daten und Durchführung der BlastN-Analysen.
- Kultivierung von Pilzen aus klinischen Proben (Rachenabstriche).
- Statistische Auswertung der Daten und Erstellung der Grafiken.
- Entwurf und Revision des Manuskripts.

Schwarz F, Becker K, **Rahn S**, Hegewald A, Pfeffer K, Henrich B. *Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. Int J Implant Dent. 2015 Dec;1(1):9.*

- Durchführung der Pan-Pilz-PCR (Realtime-PCR mit SYBR Green-Farbstoffen) für die Detektion von Pilz-DNA.
- Auswertung der PCR-Daten und Durchführung der BlastN-Analysen.

Henrich B, Rimming M, Sczyrba A, Velleuer E, Dietrich R, Gerlach W, Gombert M, **Rahn S**, Stoye J, Borkhardt A, Fischer U. *Mycoplasma salivarium as a dominant coloniser of Fanconi anaemia associated oral carcinoma. PLoS One. 2014 Mar 18;9(3):e92297.*

- Durchführung der Realtime-PCR (mit SYBR Green-Farbstoffen) für die Detektion von Pilz-DNA.
- Auswertung der PCR-Daten und Durchführung der BlastN-Analysen.



Akone SH, **Rahn S**, Henrich B, Daletos G, Vardamides JC, Nkengfack AE, Lin WH, Lai D, Proksch P. *2-Pentenedioic acid derivatives from a soil-derived fungus Gongronella butleri*. *Phytochemistry Letters*. 2014 December 10: 184-188.

- Identifizierung der *Gongronella*-Spezies.
  - Kultivierung von Pilzen.
  - DNA-Isolation von einer *Gongronella*-Spezies.
  - PCR-Analyse der ribosomalen Operonstruktur (18S rDNA und ITS1-ITS2-Region).
  - Auswertung der PCR und Durchführung der BlastN-Analysen.
  - Erstellung von multiplen Sequenz-Alignments sowie des Phylogenetischen-Baumes.

## 8.4 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anzufertigen. Nicht zuletzt möchte ich mich auch vielfach für seine persönliche Unterstützung bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht zudem an Herrn Prof. Dr. Rainer Haas, der mir durch sein Vertrauen die überaus spannende Zusammenarbeit mit der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie erst ermöglicht hat. Die konstruktiven Gespräche und sein stets offenes Ohr waren immer eine große Hilfestellung und Motivation.

Meinen besonderen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Birgit Henrich für ihre Betreuung während meiner Doktorarbeit entgegenbringen. Für die kritische Beurteilung meiner Arbeit möchte ich ihr vielfach danken und dafür, dass sie mir insbesondere in der Schlussphase meiner Promotionszeit geduldig mit Ratschlägen zur Seite stand.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Kalscheuer möchte ich mich vielfach für die Übernahme des Koreferats und des Gutachtens seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät bedanken.

Der Jürgen Manchot Stiftung danke ich für ihre finanzielle Unterstützung in Form meines Stipendiums und ihre Förderung im Rahmen der MOI Manchot Graduiertenschule „Molecules of Infection“.

Mein großer Dank geht an Frau Dr. Nicole Neuhausen für all die informativen und anregenden Gespräche. Ihre motivierenden Worte und Ratschläge bei Problemen waren immer eine große und wertvolle Unterstützung.

Herrn Dr. Mustafa Kondakci und Frau Dr. Anna Schuck möchte ich für die reibungslose Zusammenarbeit hinsichtlich der Entnahme von Patientenproben bedanken.

Bei Frau Dana Belick und Anna Mai bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag und all die beantworteten Fragen rund um die Kultivierung von Pilzen.

Ein großer und herzlicher Dank geht vor allem an Thomas Bogner und Valentina Antoni, die mir jederzeit mit offenen Ohren und aufmunternden Worten unterstützend zur Seite standen.

Ein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die mich auf jede erdenkliche Weise in sämtlichen Lebenslagen unterstützt haben. Bei euch konnte ich immer einen Ort zum Durchatmen finden.

## 8.5 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die hier vorliegende Dissertation *„Identifizierung und Epidemiologie von Pilzerregern bei immunsupprimierten Patienten mittels moderner molekularbiologischer Methoden“* von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Diese Dissertation wurde weder in ihrer vorliegenden noch in einer abgeänderten Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 04. Mai 2018

---

(Sebastian Rahn)

