



**Prospektive Studie zur klinischen Wertigkeit einer Multiplex
PCR (fuPCR) für die Detektion von invasiven Mykosen bei
immunsupprimierten Patienten**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sebastian Alexander Scharf

Düsseldorf, März 2022

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Zusammenarbeit mit der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinischer Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf

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

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. med. Rainer Haas

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

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2022

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	5
II	Tabellenverzeichnis	6
III	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	8
1.1	Humanpathogene Pilze und ihr klinisches Auftreten	8
1.2	Diagnostik von Pilzinfektionen	9
1.2.1	Klassische Diagnostik-Verfahren	9
1.2.2	Molekulargenetische Diagnostik von Pilzinfektionen	10
1.3	Zielsetzung der Dissertation	12
2.	Materialien und Methoden	13
2.1	Materialien	13
2.1.1	Patientenkollektiv und Ethikvotum	19
2.2	Mikrobiologische Methoden	19
2.2.1	Kultivierung von Pilzen	19
2.2.2	Spiken von Probenmaterial mit Pilzsuspensionen	20
2.2.3	Zelllyse-Verfahren	21
2.2.4	Bearbeitung von klinischen Patientenmaterialien	22
2.2.5	Immunologische Analyse der Serumproben	24
2.3	Molekulargenetische Methoden	24
2.3.1	Konzentrationsmessung von Nukleinsäurelösungen	24
2.3.2	Bestimmung der DNA-Fragmentlängen	24
2.3.3	Präparation von Plasmid-DNA	25
2.3.4	Realtime Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	25
2.3.5	Nukleinsäureaufreinigung	28
2.3.6	Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten	28
2.3.7	Nanopore-Sequenzierung von Metagenomen	28
2.4	Computerbasierte Methoden	28
2.4.1	Homologievergleiche mittels Blast-Analyse	28
2.4.2	Analyse von Genom-Sequenzen	29
2.4.3	Statistische Auswertungen	30
2.4.4	Graphische Auswertung	30
3.	Ergebnisse	31
3.1	Erhöhung der Ausbeute an Pilz-DNA aus klinischen Proben durch Verbesserung des Pilzaufschlusses	31
3.1.1	Flüssigstickstoff-Behandlung und Proteinase K Aufschluss führt zu keiner Steigerung der DNA-Ausbeute	34
3.1.2	Steigerung der fungalen DNA-Ausbeute durch die Einführung des „Bead beating“ Schrittes 38	

3.1.3	Fragmentierung der DNA durch „Bead beating“	40
3.1.4	Matrixeffekte bei klinischem Probenmaterial erschweren die DNA-Freisetzung.....	42
3.2	Klinische Anwendung der fuPCR unter Nutzung der verbesserten DNA-Präparation ..	44
3.2.1	Die fuPCR erweitert das Spektrum der nachgewiesenen Pilze um kulturell nicht detektierte Gattungen wie <i>Trichosporon</i> , <i>Cryptococcus</i> und <i>Fusarium</i>	50
3.2.2	Die Verwendung von Pilz-Antikörper-Assays ist für den Pilznachweis bei hämatologischen Patienten ungeeignet	55
3.2.3	Der Verlust der Immunabwehr während der hämatologischen Behandlung führt zu einer erhöhten Pilzbelastung im Respirationstrakt	58
3.3	Verbesserung der Auswertbarkeit der fuPCR	60
3.3.1	Weiterentwicklung der fuPCR durch Einführung von TaqMan-Sonden	60
3.3.2	Erfolgreicher Einsatz der Sonden basierten PCR-Ansätze bei klinischen Proben.....	71
4.	Diskussion	74
5.	Zusammenfassung.....	84
6.	Summary	87
7.	Literaturverzeichnis.....	89
7.1	Zusätzliche Tabellen	98
7.2	Publikationen	101
7.3	Danksagung.....	103
7.4	Selbstständigkeitserklärung	105

I Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verwendete Keramikugeln	22
Abb. 2: Schema der Kombination verschiedener DNA-Extraktionsschritte	33
Abb. 3: Einfluss der Behandlung von <i>Candida</i> und <i>Aspergillus</i> mit flüssigem Stickstoff und/oder Proteinase K auf Wachstum (A), DNA-Menge (B) und DNA-Zugewinn (C)	36
Abb. 4: Einfluss des „Bead beatings“ auf die fungale DNA-Freisetzung	39
Abb. 5: Fragmentlängen der extrahierten genomischen <i>Candida</i> (A) und <i>Aspergillus</i> (B) DNA	41
Abb. 6: Matrix-Effekt von respiratorischen und Blut-Proben auf die fungale DNA-Freisetzung	43
Abb. 7: VENN-Diagramm des prozentualen Anteils der in respiratorischem Spülwasser mittels fuPCR-Assay und Kultur nachgewiesenen Pilze	51
Abb. 8: Im respiratorischen Spülwasser nachgewiesene Pilzgattungen	52
Abb. 9: VENN-Diagramm des prozentualen Anteils an Pilzen, die mittels fuPCR-Assay und Serologie im Blut nachgewiesen wurden	56
Abb. 10: Mittels fuPCR-Assay detektierte Pilzgattungen in Serum, Blut und Plasma	58
Abb. 11: Schematische Darstellung der Bindungsstelle der Sonde Pan-S	62
Abb. 12: Multiples Alignment der Bindungsstellen der Sonde Pan-S und des Primers 18SR	62
Abb. 13: Vergleich der Detektionsgrenzen der fuPCR-Reaktionen im SYBRGreen- und TaqMan-Ansatz	64
Abb. 14: Amplifikationskurven von <i>P. chrysogenum</i> und <i>S. apiospermum</i> mit SYBRGreen- und TaqMan-Ansatz	65
Abb. 15: Multiples Alignment der Bindungsstelle der neuen Sonden Rhizo-S, Absgla-S und Lichcor-S	68
Abb. 16: Amplifikation genomischer DNA in fuPCR Reaktionen B und C in SYBRGreen- und TaqMan-Ansätze	69
Abb. 17: Alignment der Sequenzen von <i>Lichtheimia corymbifera</i> (DSM 1144) mit Primern (LicF1 und 18SR) und Sonde (Lichchor-S)	70

II Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der Verbrauchsmaterialien	13
Tab. 2: Liste der Chemikalien, Pufferlösungen und Enzyme	13
Tab. 3: Liste der Geräte und Apparaturen	14
Tab. 4: Liste der Kits	15
Tab. 5: Liste der Kulturmedien	15
Tab. 6: Liste der Pilzstämmen	16
Tab. 7: Liste der pGemT-Plasmide mit fuPCR-Produkten als Inserts	17
Tab. 8: Liste der Oligonukleotide	18
Tab. 9: Liste der Mastermixe	19
Tab. 10: Extrahierte DNA Mengen aus Patientenproben	23
Tab. 11: Liste der PCR Zusammensetzungen	26
Tab. 12: Anregungs- und Emissionswellenlänge der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	27
Tab. 13: Zusammensetzung der Referenz-Datenbank	29
Tab. 14: Mittlere OD ₆₀₀ -Werte und KBE der eingesetzten Pilzsuspensionen	32
Tab. 15: Charakteristika der Studienkohorte	45
Tab. 16: Therapiestatus bei Zeitpunkt der Probennahme	46
Tab. 17: Ergebnisse aus IK- und Gap-PCR für Proben von Patienten und Kontrollprobanden	48
Tab. 18: Nachgewiesene Pilze in fuPCR und Nanopore-Sequenzierung	54
Tab. 19: Korrelationen der Häufigkeit der Pilznachweise mit der Studienkohorte	59
Tab. 20: Pilzspezies für das multiple Alignment	61
Tab. 21: Vergleich von Linearität und Effizienz der Amplifikation der fuPCR-Reaktionen mit SYBRGreen- und TaqMan-Ansatz	66
Tab. 22: Vergleich der CT-Werte von SYBRGreen- und TaqMan-PCR-Ansatz	72
Tab. 23: Detektierte Pilze im respiratorischen Spülwasser	99
Tab. 24: Detektierte Pilze im Blut	100

III Abkürzungsverzeichnis

BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland
bp	Basenpaare (base pair)
CT	Schwellenwert-Zyklus (Cycle Threshold)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii; und andere
g	Beschleunigung (ca. 9,81 m/s ²)
HPC	High Performance Computing (HPC)- System HILBERT der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland
ITS	interner transkribierter Platzhalter (internal transcribed spacer)
KBE	koloniebildende Einheiten
n	Anzahl
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
WGS	Sequenzierung des gesamten Genoms (Whole Genome Sequencing)

1. Einleitung

1.1 Humanpathogene Pilze und ihr klinisches Auftreten

Aufgrund steigender Inzidenzen und hoher Sterblichkeitsraten hat die Relevanz von invasiven Pilzinfektionen in den letzten 30 Jahren stark zugenommen (1-3). Jährlich sterben ca. 1,5 Millionen Menschen an invasiven Pilzinfektionen, mehr als an Malaria oder Tuberkulose (4). Bei immunsupprimierten Patienten steigt seit 1980 die Häufigkeit invasiver Pilzkrankungen wie Candidose oder Aspergillose stetig an, wobei dies besonders nach einer Organtransplantation wegen ihrer schweren Komplikationen mit hoher Morbidität und Mortalität gefürchtet ist (5). Bei Blutstammzelltransplantation wird in Abhängigkeit von der Grunderkrankung und dem Grad der Komorbidität bei bis zu 23% der Patienten eine invasive Pilzinfektion beobachtet, die mit einer Sterblichkeitsrate zwischen 20% und 75% einhergeht (6).

Eine vermehrte Pilzbesiedlung der Atemwege ist bei immungeschwächten Patienten häufig und hängt nicht nur von der Grunderkrankung, sondern auch von Dauer und Intensität einer möglichen zytotoxischen Chemotherapie ab, wobei die myeloablative Konditionierungstherapie vor einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation die intensivste Form darstellt (7). Nach längeren Phasen der Neutropenie unter Verabreichung zumeist unterschiedlicher und vielfach kombinierter Antibiotika zur Vermeidung bakterieller Infektionen sind Pilzinfektionen der Lunge keine Seltenheit.

Humanpathogene Pilze werden häufig nach dem DHS-System nach Reith in drei Gruppen unterteilt: Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze, wobei Pilzinfektionen der Lunge hauptsächlich durch Schimmelpilze wie *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Fusarium* verursacht werden. Es gibt jedoch auch zunehmend Fallberichte über Hefen wie *Trichosporon* und *Cryptococcus*, die bei immunsupprimierten Patienten Pneumonien hervorrufen (8-13). Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass die *Candida*-Besiedlung der Atemwege mit dem Risiko einer invasiven Candidose zusammenhängt, wird die pathologische Bedeutung des Nachweises von *Candida* in den Atemwegen immer noch kontrovers diskutiert, da *Candida* normalerweise nur kolonisiert und im immunkompetenten Organismus apathogen ist (14-17).

Da die Lunge häufig der erste Ort des Kontaktes mit Pilzpathogenen darstellt, ist der frühzeitige Nachweis einer Pilzbesiedlung der Atemwege eine essenzielle

Voraussetzung für eine effektive antimykotische Therapie (11, 18-20). Die Lunge ist jedoch nicht nur ein Infektionsort, sondern auch eine Eintrittspforte für fungale Erreger, die dann über die Blutbahn zur Sepsis und zu disseminierten Organinfektionen führen können (1-3, 6, 21-27). In der klinischen Praxis werden zur Pilzdiagnostik deshalb in der Regel Proben aus den oberen Atemwegen oder dem Blut entnommen.

Bei immungeschwächten Patienten ist *Candida* häufig der Auslöser einer Sepsis (4). Eine durch *Cryptococcus* und *Trichosporon* verursachte Sepsis ist weniger häufig, jedoch wenn sie auftritt, akut lebensbedrohlich, da diese Pilze bei immunsupprimierten Patienten über die Blutbahn Infektionen der Milz und des zentralen Nervensystems (ZNS) verursachen (18, 28-32). *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* sind ebenfalls Erreger invasiver Infektionen (10, 33-38) und befallen u.a. Niere, Leber, Lymphknoten und das zentrale Nervensystem (ZNS) (18, 28-32).

1.2 Diagnostik von Pilzinfektionen

1.2.1 Klassische Diagnostik-Verfahren

Mikroskopie und Kultivierung von Sputum, bronchoalveolärer Lavage, Rachenabstrichen, Gewebe- und Blutproben stellen gängige Nachweismethoden für Pilze dar. Zusammen mit serologischen Tests zum Nachweis von Pilzzellwandbestandteilen (Antigen-Nachweise) und zum Nachweis von *Candida*- und *Aspergillus*-Antikörpern gehören sie zu den Standardmethoden zur Diagnose von Pilzinfektionen (39).

Der mikroskopische Nachweis von Pilzen in Spülflüssigkeit der oberen Atemwege liefert Ergebnisse innerhalb kurzer Zeit, ist aber von geringer Sensitivität (39-41). Die Kultivierung wiederum hat den Nachteil, dass aufgrund des langsamen Wachstums insbesondere von Fadenpilzen (wie *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* oder *Mucorales*) viel Zeit vergeht, bis ein Ergebnis vorliegt (39).

Für den Pilznachweis in Blutproben werden die Kultur und serologische Tests verwendet. Serologische Nachweise beruhen auf der Detektion von Antikörpern der Klassen IgM (akute systemische Infektion), IgA (akute lokale Infektion) und IgG (länger zurückliegende Infektion) gegen *Candida* (42) und *Aspergillus* (43), und von Antigenen, wie z.B. Pilzzellwandbestandteilen β -D-Glucan (Nachweis von Pilzen

allgemein), Kapselpolysacchariden (*Cryptococcus*), Galactomannan (*Aspergillus*) oder Mannan (*Candida*) (20, 39, 44). Serologische Tests liefern Ergebnisse innerhalb weniger Stunden, während für einen Nachweis per Kultur mehrere Tage benötigt werden. Das Ergebnis serologischer Tests ist prinzipiell schwer interpretierbar. So ist die Antikörper-Produktion bei immunsupprimierten Patienten generell verringert, was bei diesen zu geringen Nachweisraten trotz des Vorhandenseins von Pilzen führt (45, 46). Ein weiteres Problem ist die geringe Sensitivität und Spezifität der serologischen Nachweise (41, 46, 47). Den gleichen Nachteil haben auch Blutkulturen in Bezug auf den Nachweis von Schimmelpilzen (41, 46, 47).

1.2.2 Molekulargenetische Diagnostik von Pilzinfektionen

Molekulargenetische Methoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bieten den Vorteil eines Pilz-(DNA)- Nachweises innerhalb weniger Stunden in ganz unterschiedlichen Arten von Proben, wie respiratorische Spülflüssigkeiten, Sputum, Gewebe, Blut, Serum oder Plasma (48). Abhängig von der Spezifität der verwendeten Primer (und ggfls. Sonden) lassen sich mithilfe von PCR-Assays einzelne Pilzspezies wie *Candida albicans* (49) oder *Aspergillus fumigatus* (50) nachweisen. Darüber hinaus lassen sich auch ganze Pilz-Gattungen wie *Candida* oder *Aspergillus* identifizieren (51). Schließlich können mittels Broad-Range- oder Pan-PCRs auch breite Spektren von Pilzen untersucht werden(52-55), wobei im Falle einer positiven Probe, deren Speziesidentität mit Hilfe einer nachgeschalteten Analyse der PCR Produkte (z.B. Sanger-Sequenzierung und Homologiesuche mittels BLAST-Analyse) identifiziert werden kann (51, 56-58). PCRs für die Detektion von Pilz-DNA wurden bereits hinsichtlich einer Aufnahme in aktuelle Leitlinien zur Diagnostik von Pilzinfektionen (59, 60) geprüft. Die Autoren waren sich einig, dass PCR-Methoden bei der Diagnose von Pilzinfektionen hilfreich sein können, jedoch noch eingehender standardisiert und klinisch validiert werden müssten.

2016 entwickelten Rahn et al. die fuPCR (57), bei der in sieben pilzgruppenspezifischen PCR-Reaktionen (A bis G) die häufigsten Schimmelpilze, wie *Aspergillus*, *Penicillium* (A), *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* (B), *Absidia*, *Lichtheimia*, *Cunninghamella* (C), *Fusarium* und *Scedosporium* (D), und Hefen, wie *Cryptococcus* (E), *Trichosporon* (F), *Candida*, *Cladosporium*, *Saccharomyces* und *Alternaria* (G) amplifiziert und positive Proben in einer nachfolgenden Analyse (Sanger-

Sequenzierung und BLAST Analyse) identifiziert wurden. Eine Pan-Pilz-PCR wurde zusätzlich als Backup-Reaktion für seltene Pilzarten eingeführt, die möglicherweise in keiner der zweigspezifischen Reaktionen nachzuweisen wären. In einer Pilotstudie, in der 56 respiratorische Abstriche von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen mittels fuPCR analysiert wurden, führte die fuPCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung zur Identifizierung von *Saccharomyces* (47% der detektierten Pilze), *Candida* (39%), *Alternaria* (8%) und *Cladosporium* (6%) (57). So konnte gezeigt werden, dass die fuPCR sich für die Detektion von pathogenen Pilzen (hauptsächlich Hefen) in respiratorischen Proben hämatologischer Patienten eignete.

Neuere molekulargenetische Methoden, wie das „Whole genome sequencing“ (WGS) bieten die Möglichkeit, mit nur einer Analyse das gesamte Mikrobiom, inklusive des Mycobioms, in einer Probe zu charakterisieren. Außerdem lassen sich über die Detektion von „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) Mutationen in Zusammenhang mit der Entwicklung antifungaler Resistenzen nachzuweisen (54, 61). Allerdings haben diese Analysen bis heute nur für bakterielle Erreger Einzug in die Routinediagnostik gehalten (54, 62).

Der Erfolg und die Sensitivität jeder molekulargenetischen Methode hängt in erster Linie von einer effizienten Extraktion genomischer DNA aus der Pilzzelle ab. Bei der Extraktion gibt es zwei entscheidende Schritte, den Aufschluss der Pilzzellwand durch Lyse der Zellen und die anschließende Isolierung der freigesetzten genomischen DNA unter Entfernung von Substanzen, die bei der molekulargenetischen Methode stören könnten (58). Hefen und Schimmelpilze unterscheiden sich in ihrem Zellwandaufbau, was der entscheidende Grund für das unterschiedliche Verhalten beim Zellaufschluss ist. Während Hefen und Schimmelpilze gleichermaßen in ihrer inneren Skelettzellwand (1,3)- β -D-Glucan und Chitin enthalten, findet sich in der äußeren Schicht der Hefe-Zellwand zusätzlich ein Netzwerk aus Mannan- und Proteinstrukturen. Diese Mannanketten sind in der äußeren Zellwand von Schimmelpilzhyphen, typisch für viele Schimmelpilze wie z.B. *Aspergillus*, mit Galactofuran modifiziert und bilden ein dichtes Netzwerk. Konidien, die die robuste thalliche Form von Schimmelpilzzellen darstellen, sind mit einer äußeren Schicht aus hochhydrophoben Strukturen und einer inneren Melaninschicht überzogen (63). Die hohe Resistenz der äußeren Zellwand beider Zelltypen, Hyphen und Konidien, erschwert eine effektive Lyse der Schimmelpilze. Neuere DNA-Extraktionsprotokolle versuchen dem schon Rechnung zu tragen und

verwenden neben enzymatischen (64-66) und chemischen (67) auch physikalische Aufschlussmethoden wie Flüssigstickstoff-Behandlung (68, 69)) oder das mechanische „Bead beating“ (70-72)). Beim „Bead beating“ werden die Pilzzellwände aufgebrochen, indem Glas- oder Keramikkügelchen, sogenannte Beads, mit hohen Geschwindigkeiten auf die Pilzzellwand auftreffen und diese aufbrechen.

Häufig wurde in bisherigen Studien zur Validierung von DNA-Extraktionsprotokollen für die PCR-basierte Pilzdiagnostik der Aufschluss von Pilzen nur in Pufferlösungen und nicht auch in klinischen Proben untersucht. Daher blieben in diesen Studien mögliche Matrixeffekte der Probenart (Blut, BAL, Gewebe) auf die Extraktionseffizienz der Pilz-DNA unberücksichtigt. Auch wenn die European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI) im Jahr 2010 ein standardisiertes Protokoll für die Extraktion von *Aspergillus*-DNA aus Vollblut, Serum und Plasma publizierte (73, 74), welches einen mechanischen Aufschluss der Pilzzellwand mittels „Bead beating“ vorsieht, konnte bisher kein Konsens über das effizienteste Protokoll für die DNA-Extraktion anderer Pilze des oberen Respirationstraktes erzielt werden. Ebenso wenig existieren standardisierte Protokolle für die Extraktion aus respiratorischer Spülflüssigkeit.

1.3 Zielsetzung der Dissertation

Ziel dieser Dissertation war die Verbesserung der fuPCR zur Nutzung für die Pilzdiagnostik bei Patienten. Hierzu sollte die Effizienz der DNA-Extraktion aus Pilzzellen verbessert werden. Der klinische Nutzen der fuPCR und des veränderten Zellaufschlusses sollte an respiratorischen wie auch Blutpräparaten hämatologischer Patienten durch einen direkten Vergleich mit der Routinediagnostik (Mikroskopie, Kultur und Serologie) ermittelt werden. Außerdem sollte die Auswertbarkeit der fuPCR-Ergebnisse durch Weiterentwicklung der Methodik und Einsatz fluoreszenzmarkierter TaqMan-Sonden optimiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Tab. 1: Liste der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Einmalhandschuhe Nitra-Tex Micro-Touch	Ansell (Richmond, Australien)
Vernichtungsbeutel REF 95.1297	Sarstedt (Rheinbach, Deutschland)
Kanülen-Sterican	Braun (Melsungen, Deutschland)
Parafilm M	Bemis (Neenah, U.S.A.)
Deckgläschen	VWR (Radnor, U.S.A.)
Impfeschlingen 10 µL	Sarstedt (Rheinbach, Deutschland)
TipOne Graduated Filter (10 bis 1000 µL)	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Küvetten	Sarstedt (Rheinbach, Deutschland)
Reagiergefäß 50 mL, 114x28 mm, PP	Sarstedt (Rheinbach, Deutschland)
Reagiergefäß 15 mL, 120x17 mm, PP	Sarstedt (Rheinbach, Deutschland)
Nunc CryoTube Vials (1,8 bis 4,5 mL)	Thermo Fisher Scientific
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 mL	Sarstedt (Rheinbach, Deutschland)
Precellys Lysing Kit 1,4 mm Bead-Tubes	Bertin Technologies (Montigny-le-Bretonneux, Frankreich)
FrameStar Break-A-Way PCR Platte	4titude (Wotton, U.K.)
8 Flat Optical Caps Streifen	4titude (Wotton, U.K.)
Eppendorf Tube 1,5 mL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Tube 2,0 mL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
DNA LoBind Tube 1,5 mL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Tab. 2: Liste der Chemikalien, Pufferlösungen und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Ampuwa Wasser für Injektionszwecke	Fresenius (Bad Homburg, Deutschland)
Destilliertes Wasser Ultra Pure DNase/RNase Frei	Invitrogen (Carlsbad, U.S.A.)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, U.S.A.)
10 mM Tris/HCl, pH 7,5	Eigenherstellung
Proteinase K Lösung	Qiagen (Hilden, Deutschland)
G2 Digestion Puffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Tab. 3: Liste der Geräte und Apparaturen

Bezeichnung	Hersteller
Werkbank Antair BSK	Bio-Flow Technik (Meckenheim, Deutschland)
Vortexer	Labinco (Breda, Niederlande)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Heizblock Dri-Block DB-3D	Techne (Staffordshire, U.K.)
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Heraeus Megafuge 16 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, U.S.A.)
miniSpin Ultrazentrifuge (F-45-12-11)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Lichtmikroskop	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik (Friedrichsdorf, Deutschland)
Finnpipetten (10 bis 1000 µL)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, U.S.A.)
UV-Vis Spektrophotometer UV mini 1240	Shimadzu (Kyoto, Japan)
NanoDrop 100 Spektrophotometer	Peqlab VWR (Radnor, U.S.A.)
Invitrogen Qubit 3.04 Fluorometer	Invitrogen (Carlsbad, U.S.A.)
CFX 96 Realtime System C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad (Hercules, U.S.A.)
Bead Beater Minilys	Bertin Technologies (Montigny-le-Bretonneux, Frankreich)
Bio Robot EZ1	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Thermo Scientific Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific (Waltham, U.S.A.)
Heraeus Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, U.S.A.)
ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, U.S.A.)

Tab. 4: Liste der Kits

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
EZ1-DNA-Tissue-Kit (48)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen (Carlsbad, U.S.A.)
Platelia TM-Aspergillus Antigen Kit	Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, Frankreich)
Cand-Tec Antigen IHA Kit	Ramco Laboratories (Stafford, U.S.A.)
Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay	Immy (Norman, U.S.A.)
Hemkit Aspergillus IHA	Ravo Diagnostika GmbH (Freiburg, Deutschland)
Hemkit Candida IHA	Ravo Diagnostika GmbH (Freiburg, Deutschland)
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)

Tab. 5: Liste der Kulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Sabouraud GC Agar/BBL CHROMagar Candida Medium (Biplate)	BD (Franklin Lakes, U.S.A.)
Sabouraud Dextrose GC Agar	Mast Diagnostica (Reinfeld, Deutschland)
LB(lysogeny broth)-Medium	Eigenherstellung

Die in dieser Studie verwendeten Pilzstämme waren Kulturisolate aus klinischen Proben von Patienten mit Pilzpneumonie oder invasiver Pilzinfektion (VK/VO), aus diagnostischen Ringversuchen (RV) oder aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Tab. 6).

Tab. 6: Liste der Pilzstämme

Spezies	Isolat
<i>Aspergillus versicolor</i>	RV ST.4/ 12
<i>Aspergillus fumigatus</i>	VK 8053
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSM 844
<i>Mucor circinelloides</i>	RV ST.4 /09
<i>Rhizomucor pusillus</i>	DSM 1331
<i>Rhizopus microsporus</i>	VK 18108
<i>Cunninghamella elegans</i>	DSM 63299
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	DSM 1144
<i>Absidia glauca</i>	DSM 811
<i>Fusarium oxysporum</i>	RV ST.4 /13
<i>Fusarium solani</i>	RV St.3/ 09
<i>Scedosporium apiospermum</i>	RV St.1/ 06
<i>Cryptococcus neoformans</i>	RV St.1/ 09
<i>Cryptococcus gattii</i>	RV St.3/ 17
<i>Trichosporon inkin</i>	RV St.2/ 15
<i>Trichosporon mucoides</i>	RV St.1/ 02
<i>Candida tropicalis</i>	RV St.3/ 08
<i>Candida dubliniensis</i>	RV St.2/ 06
<i>Candida krusei</i>	RV St.2/ 01
<i>Candida albicans</i>	RV St.C/ 10
<i>Candida glabrata</i>	VK 8777
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RV ST.1/ 06

Tab. 7: Liste der pGemT-Plasmide mit fuPCR-Produkten als Inserts

Plasmid- bezeichnung	Spender-Organismus	Primerpaar	Insert (bp)	Schmelz- punkt des PCR- Produktes (°C)
p_Afla	<i>Aspergillus flavus</i> RV1	AspF + 18SR	242	88,5
p_Afum	<i>Aspergillus fumigatus</i> VK50349	AspF + 18SR	242	89
p_Ater	<i>Aspergillus terreus</i> RV1	AspF + 18SR	242	89
p_Anig	<i>Aspergillus niger</i> RV2	AspF + 18SR	242	88,5
p_Pmar	<i>Penicillium marneffeii</i> RV2	AspPenF1 + 18SR	228	87,5
p_Rory	<i>Rhizopus oryzae</i> DSM 854	MucF2 + 18SR	306	81
p_Mcir	<i>Mucor circinelloides</i> RV2	MucF1 + 18SR	299	81
p_Rpus	<i>Rhizomucor pusillus</i> RV2	Muc3 + 18SR	295	80,5
p_Agla	<i>Absidia glauca</i> DSM 854	AbsF + 18SR	318	85
p_Lcor	<i>Lichtheimia corymbifera</i> DSM 1144	LicF1 + 18SR	272	81
p_Cber	<i>Cunninghamella bertholletiae</i> SP8749	AbsF + 18SR	318	79
p_Fsol	<i>Fusarium solani</i> ATTC 36031	FusF2 + 18SR	134	82,5
p_Spro	<i>Scedosporium prolificans</i> RV3	SceF + 18SR	170	84,5
p_Cneo	<i>Cryptococcus neoformans</i> RV2	CryF1 + 18SR	257	83,5
p_Tink	<i>Trichosporon inkin</i> RV2	TriF + 18SR	254	82
p_Calb	<i>Candida albicans</i> SP 22238	18sF + 18SR	536	82,5
p_Cgla	<i>Candida glabrata</i> RV3	CanF + 18SR	251	82
p_Ckru	<i>Candida krusei</i> RV1	CanF + 18SR	251	86,5
p_Cdub	<i>Candida dubliniensis</i> RV2	CanF + 18SR	251	81,5

Tab. 8: Liste der Oligonukleotide

	Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Referenz
Forward Primer	AbsF	ATYTTTGAACGCATCTTGCA	(57)
	AspF	CTGTCCGAGCGTCATTG	(51)
	AspPenF1	GTCCGAGCGTCATTTCTG	(57)
	AspPenF2	TCCGAGCGTCATTGCTG	(57)
	CanF	CCTGTTTGAGCGTCRTTT	(51)
	CryF1	GAGAGTCATGAAAATCTCAATCCCTC	(57)
	CryF2	CTGTTTGAGTGTCATGAAATCTC	(57)
	FusF1	TCCATWGCAGTAGTAGTAAAACCC	(57)
	FusF2	TCCATYGCAGTAGTAGCTAACACC	(57)
	hgap_F	CCACCCATGGCAAATTCC	(75)
	IK-F	GACGGCTCAGGACAACGGTT	(76)
	LicF1	ATTYAGTTGCTGTCATGGCC	(57)
	LicF2	CATTCAGTTGCTCTCATGGTC	(57)
	MucF1	GAACGCAWCTTGCGCTCA	(57)
	MucF2	TTGAACGCAGCTTGCACTC	(57)
	MucF3	TCATCCATTGGGTACGTCTAG	(57)
	SceF	GTAGGCCCTGAAATACAGTGG	(57)
	TriF	CATGAAATCTCAACCAYTAGGG	(57)
	5.8SF = Uni	TCTTTGAACGCACATTGCGCC	(77)
	5.8SF2 = Uni3	TCTTTGAACGCACATTGC	diese Arbeit
18SF	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(77)	
Reverse Primer	hgap-R	ATGGGATTTCCATTGATGACAAG	(75)
	IK-R	TTGCCAGCGGTGTCCG	(76)
	5.8SR	CGCTGCGTTCTTCATCG	(77)
	18SR	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(78)
Sonden	Absgla-S	HEX-TAAGTTCAGCGGGTAATCCCGCCTGATT-BHQ1	diese Arbeit
	Afla-S	Cy5-GCTTGCCGAACGCAAATCAAT-BHQ2	(51)
	Afum-S	6FAM-CAGCCGACACCCAACCTTATTTTTCTA-BHQ1	(51)
	Anig-S	6FAM-GTCACATGCTCTGTAGGATTGGCC-BHQ1	(51)
	Ater-S	HEX-CGACGCATTTTRTTTGCAACTTGTTT-BHQ1	(51)
	Calb-S	6FAM-CATTGCTTGCGGCGGTARCG-BHQ1	(51)
	Cdub-S	Cy5-CATTGCTAAGGCGGTCTCTGGC-BHQ2	(51)
	Cgla-S	HEX-GGTTTTACCAACTCGGTGTTGATCTAGG-BHQ1	(51)
	Ckru-S	6FAM-GCTGGCCGAGCGAACTAGACTTT-BHQ1	(51)
	hgap-S	FAM-TGGCACCGTCAAGGCTGAGAACG-BHQ1	(75)
	IK-S	TexasRed-ATGCCTCTTCACATTGCTCCACCTTTCCT-BHQ2	(76)
	Lichchor-S	TexasRed-TAAGTTCAGCGGGTGATCTCAGTTGATT-BHQ2	diese Arbeit

Pan-S	6FAM-TAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATT-BHQ1	diese Arbeit
Rhizo-S	CY5-TAAGTTCAGCGGGTAATCCCATCTAAGT-BHQ2	diese Arbeit

Tab. 9: Liste der Mastermixe

PCR-Typ	Mastermixe ¹	Hersteller
SYBRGreen-basierte PCR	MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay with fluorescein ²	Eurogentec (Seraing, Belgien)
	Takyon SYBR MasterMix dTTP blue With Fluorescein	Eurogentec (Seraing, Belgien)
TaqMan-PCR	Takyon No ROX Probe MasterMix UNG	Eurogentec (Seraing, Belgien)
	qPCR MasterMix -No ROX ²	Eurogentec (Seraing, Belgien)
	QuantiTect Multiplex PCR NoROX Master Mix ²	Qiagen (Hilden, Deutschland)

^{1,2}Die Mastermixe enthielten: [Reaktionspuffer, Taq-Polymerase, dNTPs und MgCl₂]¹ und zusätzlich dUTPs²

2.1.1 Patientenkollektiv und Ethikvotum

Zwischen Oktober 2017 und Mai 2019 wurden insgesamt 94 Patienten, die aufgrund schwerer hämatologischer Erkrankungen in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie der Universitätsklinik Düsseldorf behandelt wurden, sowie 40 gesunde Freiwillige in die klinische Studie eingeschlossen. Von jedem der Patienten und der freiwilligen Probanden lag eine informierte Einwilligung vor. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität (Studien-Nr.: 4146) genehmigt.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Pilzen

Zur Kultivierung von Pilzen aus den klinischen Probenmaterialien wurden Aliquots von respiratorischem Spülwasser (75 µL) und Vollblut (10 µL) bis zu 14 Tage bei 30°C kultiviert. Für das respiratorische Material wurden CHROMagar/Sabouraud-Biplates

verwendet, die eine gleichzeitige Identifizierung verschiedener *Candida*-Spezies anhand der Farbe ermöglichten (79). Die Spezies anderer Hefen wurden mittels fuPCR und Sanger-Sequenzierung (wie in Kap. 2.3.2 beschrieben) identifiziert. Für das Vollblut wurde Sabouraud-Dextrose-GC-Agar genutzt (57). Das Probenkulturvolumen entsprach der DNA-Menge, die in jeder Reaktion der fuPCR analysiert wurde. Die beiden Pilzstämme, die für Suspensionen in Spike-in-Experimenten verwendet wurden, waren Isolate aus klinischem Probenmaterial von Patienten mit fungaler Pneumonie (*A. fumigatus* VK 8053) bzw. invasiver fungaler Infektion (*C. glabrata* VK 8777). Von diesen Stämmen wurden mindestens alle 14 Tage neue Kulturen auf Sabouraud-Dextrose-Agarplatten angelegt. Für die Suspensionen wurden frisch gewachsene Pilzkolonien verwendet (< 24h).

2.2.2 Spiken von Probenmaterial mit Pilzsuspensionen

10 - 20 Pilzkolonien wurden in 1,5 mL PBS (durch Rühren mit einer sterilen Impföse suspendiert. Zur Validierung unterschiedlicher DNA-Extraktionsmethoden und Kombinationen dieser Methoden wurden PBS, respiratorisches Spülwasser und Blut gesunder Probanden jeweils mit 1/10 Vol. der Suspensionen von *C. glabrata* (VK 8777) oder *A. fumigatus* (VK 8053) versetzt. Zellen und unlösliches Material des gespikten respiratorischen Spülwassers wurden etwa 7,5-fach durch Zentrifugation konzentriert (12.000xg, 10 min bei Raumtemperatur). Die Sedimente wurden in Puffer G2 des EZ1-DNA-Tissue-Kits resuspendiert.

Die Dichte der Pilzzellsuspensionen in PBS wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) überprüft (UV mini 1240). Die Messung der optischen Dichte beruht auf der, durch in den Suspensionen vorhandenen Pilzzellen, erzeugten Lichtstreuung. Dieser „Lichtverlust“ wird als optische Dichte bei 600 nm gemessen. Die OD_{600} der Pilzsuspensionen sollte zwischen 1,5 - 2,4 liegen, was 4×10^7 – 7×10^8 Pilzzellen/ml Suspension entsprach.

Um die Zahl der Pilzzellen in den Suspensionen zu quantifizieren, wurde die Anzahl von Konidien und Hyphen gezählt. Zur Auszählung wurde eine Neubauer-Kammer verwendet. Die Pilzsuspensionen wurden mit Trypanblau-Lösung (0,4% Trypanblau in physiologischer Kochsalzlösung) in einem Verhältnis 1:1 gemischt und 10 μ L auf die Zählkammer gegeben. Die durch den blauen Farbstoff angefärbten Zellen wurden

anschließend unter dem Mikroskop (100-fache Vergrößerung) gezählt. Konidien lagen als einzelne eingefärbte Zellen vor, während Hyphen als größere eingefärbte Zellverbände vorlagen, sodass sich ihre Zahl nur abschätzen ließ. Die Grundfläche der Neubauer-Kammer setzt sich aus vier großen Quadranten zusammen, die jeweils in 16 (4 x 4) kleinere Quadranten unterteilt sind. Die Konidien und Hyphen innerhalb aller kleinen Quadranten wurden gezählt, sodass für jeden der vier großen Quadranten ein Wert vorlag. Aus diesen Werten wurde ein Mittelwert errechnet, der mit 1000 multipliziert der Konidien- bzw. Hyphenzahl pro mL entsprach. Anschließend wurde die Konidienzahl durch die Hyphenzahl geteilt, um zu ermitteln, in welchem Verhältnis Konidien und Hyphen in den Suspensionen vorlagen.

Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Pilzzellen in den Suspensionen wurden diese seriell 1/10 bis zu 10^{-8} verdünnt und 10 μ L jeder Verdünnung auf Sabouraud Dextrose GC Agar ausplattiert. Nach einer Inkubation von 4 Tagen bei 30 °C wurde die Anzahl der Kolonien gezählt und auf ein Inokulum von 1×10^8 Zellen normalisiert.

2.2.3 Zellyse-Verfahren

Um Pilzzellen enzymatisch aufzuschließen, wurden die Proben mit Proteinase K (6 mAu \pm 0.2 mg pro 200 μ L Probenvolumen) für 1 Stunde bei 56°C inkubiert (64).

Für eine physikalische Zellyse wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff behandelt. Dabei durchliefen sie drei Zyklen des folgenden Protokolls: Einfrieren in Stickstoff für 1 min und anschließendes Erhitzen bei 95°C für 2 min, bis sie vollständig aufgetaut waren (69).

Für den Zellaufschluss per „Bead beating“ wurden die Proben in Röhrchen aus dem Precely Lysing Kit überführt, die Keramikugeln mit einem Durchmesser von 1,4 mm enthielten (Abb. 1). Mit dem Minilys Personal Homogenizer wurden die Proben anschließend für 4 min bei 5.000 Upm homogenisiert (64).



Abb. 1: Verwendete Keramikugeln

Das „Bead beating“ erfolgte entweder einmalig, entweder vor oder nach der Proteinase K Inkubation oder dreimalig während der Proteinase K Behandlung nach 20, 40 und 60 min für jeweils 4 min.

Um die Pilzzellen chemisch zu lysieren, wurden 200 μ L der Proben für eine semiautomatische (mikrobielle und humane) genomische DNA-Präparation entnommen und in 50 μ L Elutionspuffer unter Verwendung des EZ1-DNA-Tissue-Kits und des "Bacteria 200 μ L"-Protokolls (Version 1.0) des EZ1-BioRoboters eluiert (64).

2.2.4 Bearbeitung von klinischen Patientenmaterialien

Jedes Probenet bestand aus vier verschiedenen Probenmaterialien: Respiratorisches Spülwasser sowie Vollblut, Plasma und Serum.

Zur Gewinnung des respiratorischen Spülwassers gurgelten die Patienten und Probanden mit 10 ml sterilem *Ampuwa*-Wasser, um so mögliche Pilzpathogene aus den oberen Atemwegen zu gewinnen. Zellen des respiratorischen Materials (1.500 μ L) wurden durch Zentrifugation sedimentiert (12.000 x *g*, 10 min bei Raumtemperatur) und das Sediment in 200 μ L Puffer G2 aus dem EZ1-DNA-Tissue-Kit um das 7,5-fache konzentriert.

Das Serum wurde durch Zentrifugation (1.630 x g, 10 min bei Raumtemperatur) von der koagulierten Blutfraktion getrennt.

Plasma wurde durch Zentrifugation von nicht koaguliertem (EDTA-haltigem) Vollblut (12.000 x g, 10 min bei Raumtemperatur) als Überstand der Zellfraktion (die Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten enthält) gewonnen.

Die Proben wurden bei -20 °C bis zur DNA-Extraktion gelagert.

200 µL respiratorisches Spülwasser oder Vollblut wurden mittels „Bead beating“ behandelt (Kapitel 2.2.3). Plasma- und Serum-Proben erfuhren kein „Bead beating“. Nach diesem Schritt erfolgte für Spülwasser, Vollblut und Plasma die Proteinase K Inkubation (Kapitel 2.2.3). Anschließend wurde die genomische DNA aus 200 µL der vorbehandelten Proben (respiratorisches Spülwasser, Vollblut, Plasma) sowie dem Original-Serum unter Verwendung des semiautomatischen EZ1-BioRobot extrahiert (Kapitel 2.2.3). Die DNA wurde in 50 µL Elutionspuffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung für die PCR oder Genomsequenzierung bei -20°C gelagert.

Im Schnitt ließ sich am meisten DNA extrahieren aus den respiratorischen Proben (43 ng/µL), gefolgt von Vollblut (31,2 ng/ µL), Plasma (10,8 ng/ µL) und Serum (3,7 ng/µL). Die extrahierten DNA Mengen streuten allerdings über einen Bereich von bis zu 500 ng/ µL, wie Tab. 10 zu entnehmen ist.

Tab. 10: Extrahierte DNA Mengen aus Patientenproben

Probenmaterial	Menge extrahierter DNA (ng/ µL)		
	Durchschnittlich	Minimal	Maximal
Respiratorisches Spülwasser	43,0	1,6	520,8
Vollblut	31,2	1,3	126,3
Plasma	10,8	0,1	48,9
Serum	3,7	0,3	29,9

2.2.5 Immunologische Analyse der Serumproben

Die bei -20 °C gelagerten Serumproben wurden für die serologische Analyse auf die Anwesenheit von Pilzantigenen (*Aspergillus*, *Candida* und *Cryptococcus*) und Antikörpern (*Aspergillus* und *Candida*) getestet. Es wurden handelsübliche Kits verwendet und die Experimente wurden gemäß den Anweisungen der Hersteller durchgeführt: *Aspergillus*-Antigen-Assay (Platelia TM-*Aspergillus* Antigen Kit), *Candida*-Antigen-Assay (Cand-Tec Antigen IHA Kit), *Cryptococcus*-Antigen-Assay (Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay), *Aspergillus*-Antikörper-Assay (Hemkit *Aspergillus* IHA) und *Candida*-Antikörper-Assay (Hemkit *Candida* IHA). Antikörper-Assays mit einem Titer $\geq 1:160$ und Antigen-Assays mit einem Titer $\geq 1:2$ wurden als positiv bewertet.

2.3 Molekulargenetische Methoden

2.3.1 Konzentrationsmessung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration, der im EZ1-Elutionspuffer gelösten extrahierten genomischen DNA wurde durch zwei unterschiedliche Verfahren ermittelt. Mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Standardeinstellungen für Nukleinsäure-Quantifizierung; Software Version 3.8.1) wurden die DNA spektrophotometrisch quantifiziert. Um das Absorptionsverhalten des Lösungsmittels zu bestimmen, in dem die DNA vorlag (Wasser, EZ1-Elutionslösung oder 10 mM Tris HCl pH 7,5), wurde vor jeder Messung eine Referenzmessung (Blank) mit dem Lösungsmittel durchgeführt.

Fluorometrisch wurde die DNA-Menge mit dem Invitrogen Qubit 3.04 Fluorometer (Standardeinstellungen für Messung von doppelsträngiger DNA, High Sensitivity; Software Version APP v1.02 + MCU v=.21) gemessen.

2.3.2 Bestimmung der DNA-Fragmentlängen

Zur Bestimmung der DNA-Fragmentlängen wurde die genomische DNA auf einen Konzentrationsbereich von 0,5 – 1,5 ng/ μ L eingestellt und auf einem ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer mit der Methode DNF-464-33 zur Analyse großer Fragmente von 50 kb im BMFZ analysiert.

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-tragenden *E. coli* Stämme (siehe Tab. 7) wurden aus -80 °C gelagerten Glycerin-Stocks (50 µL) in LB/AMP-Medium (5ml) über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Plasmide wurden aus 4 mL Kultur mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit nach Herstellerprotokoll (Version Dezember 2004) aufgereinigt. Das Elutionsvolumen der Plasmid-DNA betrug 50 µL. Die Plasmidkopien/µL wurden mit nachfolgender Formel berechnet und die Plasmidpräparationen anschließend auf eine Konzentration von 1 x10⁹ DNA-Kopien/µL eingestellt.

$$\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{L}} = \text{Konzentration Plasmid_DNA} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right) \times \frac{9,13 \times 10^8 \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right)}{\text{Größe Vektor}^1 \text{ und PCR_Produkt}^2 \text{ (kbp)}}$$

¹pGemT = 3,003 Kbp

²siehe Tab. 7

Zur Verwendung als Quantifizierungsstandard für die jeweilige fuPCR-Reaktion wurden die Plasmidlösungen anschließend 1/10 verdünnt auf Konzentrationen zwischen 1 x10⁵ Kopien/µL und 1 x10¹ Kopien/µL eingestellt.

2.3.4 Realtime Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche qPCR-Verfahren durchgeführt: qPCRs unter Visualisierung des PCR-Produktes durch DNA-interkalierende-Fluorophore (SYBRGreen) und Sonden-basierte TaqMan-PCRs unter Verwendung sequenzspezifischer, fluoreszenzmarkierter Sonden. Bei SYBRGreen-basierten PCRs enthielt jeder 25 µL PCR-Ansatz SYBRGreen-haltigen 1x-Mastermix (Tab. 9), sowie jeweils 0,4 µM Forward- und Reverseprimer. Bei TaqMan-PCRs enthielt jeder 25 µL PCR-Ansatz 1x-Mastermix ohne Fluorophor (Tab. 9), jeweils 0,4 µM Forward- und Reverseprimer, sowie je 0,2 µM TaqMan-Sonde (siehe Tab. 11). Außerdem beinhalteten sämtliche PCR-Ansätze 300 U N-Uracil-Glykosylase die eventuell verschleppte PCR-Produkte vor der Amplifizierung abbaute und somit deren Vervielfältigung in der PCR verhinderte.

Der PCR-Mix, der als interne Kontrolle zum Ausschluss einer PCR-Inhibition genutzt wurde (IK-PCR), enthielt zusätzlich 2,5 x 10² Kopien des Plasmids p_IK-GI.

Tab. 11: Liste der PCR Zusammensetzungen

PCR	Forward Primer	Reverse Primer	Sonde*	Zum Nachweis von
fuPCR Pan 2.1	18SF	5.8SR	-	Pilzen allgemein
fuPCR Pan 2.2	Uni oder Uni3	18SR	Pan-S	Pilzen allgemein
fuPCR A	AspF	18SR	Pan-S	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
	AspPenF1			
	AspPenF2			
fuPCR B	MucF1	18SR	Absgla-S Rhizo-S	<i>Mucor, Rhizomucor, Rhizopus</i>
	MucF2			
	MucF3			
fuPCR C	AbsF	18SR	Absgla-S Lichchor-S	<i>Absidia, Lichtheimia, Cunninghamella</i>
	LicF1			
	LicF2			
fuPCR D	FusF1	18SR	Pan-S	<i>Fusarium, Scedosporium</i>
	FusF2			
	SceF			
fuPCR E	CryF1	18SR	Pan-S	<i>Cryptococcus</i>
	CryF2			
fuPCR F	TriF	18SR	Pan-S	<i>Trichosporon</i>
fuPCR G	CanF	18SR	Pan-S	<i>Candida, Saccharomyces</i>
Afla+Afum PCR	AspF	18SR	Afla-S Afum-S	<i>Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus</i>
	AspPenF1			
	AspPenF2			
Anig+Ater PCR	AspF	18SR	Anig-S Ater-S	<i>Aspergillus niger, Aspergillus terreus</i>
	AspPenF1			
	AspPenF2			
Calb+Cdub PCR	Can F	18SR	Calb-S Cdub-S	<i>Candida albicans Candida dubliniensis</i>
Cgla+Ckru PCR	Can F	18SR	Cgla-S Ckru-S	<i>Candida glabrata Candida krusei</i>
Humane Gap PCR	hgap_F	hgap_R	hgap_S	Humaner DNA
IK PCR	IK-F	IK-R	IK-S	Internem Kontroll-Plasmid

*Sonden wurden nur bei TaqMan-PCRs verwendet. Bei SYBRGreen-basierten PCRs wurden die Sonden weggelassen.

Den PCR-Mixen wurden anschließend 2,5 µL DNA-Probe zugegeben. Um Kontaminationen der Mastermixe mit DNA zu vermeiden, erfolgte die Zugabe der DNA-Proben räumlich getrennt von der Herstellung der PCR-Ansätze. Genomische DNA von Pilzisolaten (Tab. 6) wurden in Konzentrationen von 0,05 pg/µL bis 5,0 ng/µL

eingesetzt, plasmid-kloniertes PCR Produkt als Quantifizierungsstandard (Tab. 7) in Konzentrationen von 1×10^1 bis 1×10^7 Kopien/ μ l; und DNA von Patientenproben in Konzentrationen von 0,1 - 500 ng/ μ L.

Die PCR-Amplifikation erfolgte auf CFX Thermocyclern mit folgendem Protokoll: 50 °C für 10 min (Lyse von möglichen kontaminierenden PCR-Produkten durch N-Uracil-Glykosylase), 95 °C für 10 min (Denaturierung des DNA-Doppelstrangs), gefolgt von 40 Zyklen mit 95 °C für 15 s und 60 °C für 1 min (Anlagerung der Primer und Elongation durch die Taq-Polymerase). Nach Ablauf der 40 Zyklen wurde der sogenannte CT-Wert („cycle threshold“) bestimmt. Es handelt sich dabei um den Schwellenwert, ab dem die PCR die DNA exponentiell amplifiziert. Dabei gilt: Je mehr DNA in der Probe als Matrize zur Verfügung steht, desto früher wird der CT-Wert erreicht.

Bei SYBRGreen-basierten PCRs wurde eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen. Nach 95 °C für 15 s und 60 °C für 1 min wurde die Temperatur von 65 °C kontinuierlich alle 15 s um 0,5 °C auf bis zu 95 °C erhöht. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am Ende jeder Temperatur-Erhöhung. Anhand des niedrigeren Schmelzpunktes ließen sich somit Primer Dimere von PCR-Produkt unterscheiden. Bei PCR-Ansätzen mit TaqMan-Sonde entfiel die Schmelzkurven-Analyse und die Zahl der Amplifikationszyklen war auf 45 erhöht. Die Amplifikationskurven wurden entsprechend der an die Sonden gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe (6-Carboxyfluorescein (6-FAM), Hexachlorofluorescein (HEX), Cyanin-5 (Cy5) oder Sulforhodamin-101-Sulfonylchlorid (TexasRed) sichtbar. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der vier Farbstoffe sind in der nachfolgenden Tab. 12 angegeben.

Tab. 12: Anregungs- und Emissionswellenlänge der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungswellenlänge (nm)	Emissionswellenlänge (nm)
6-FAM	494	520
HEX	535	556
Cy5	649	666
TexasRed	596	615

2.3.5 Nukleinsäureaufreinigung

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll („PCR clean-up, gel extraction User manual“, Rev. 04). Eingesetzt wurden 25 µL der positiven PCR-Reaktion und das abschließende Elutionsvolumen betrug 20 µL. Die anschließende Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop 1000 Spektrophotometer ergab eine durchschnittliche Konzentration der PCR-Produkte von 14 ng/µL. Die Werte streuten zwischen minimal 4 und maximal 52 ng/µL.

2.3.6 Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten

50 ng, gemessen mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer, der aufgereinigten PCR-Produkte wurden für eine Sanger-Sequenzierung ins BMFZ gegeben. Sequenziert wurde mit dem Primer 18SR unter Verwendung des Programms Xpert-S für Sequenzen bis 500 bp.

2.3.7 Nanopore-Sequenzierung von Metagenomen

1000 ng genomische DNA einer respiratorischen Probe wurde nach dem Protokoll „1D Native barcoding genomic DNA (with EXP-NBD103 and SQK-LSK 108)“ (Version: NBE_9006_v103_revO_21Dec2016) mit einem spezifischen Barcode versehen. Anschließend wurden 6 Proben mit einer Nanopore MinION Flow Zelle (Version R.9.4) (mindestens 900 verfügbare Nanoporen) unter Verwendung der Software MinKNOW (Version 20.06.5) sequenziert.

2.4 Computerbasierte Methoden

2.4.1 Homologievergleiche mittels Blast-Analyse

Aus Sanger-Sequenzierungen erhaltene Sequenzen wurden mit paarweisem Sequenzabgleich gegen die nr/nt NCBI-Datenbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, letzter Zugriff am 21.05.2020) mit den beiden Algorithmen „Somewhat similar sequences (blastn)“ (80) und „Highly similar sequences (megablast)“ (80)) und gegen die CBS-Pilz-Datenbank des Westerdijk Instituts (<http://www.wi.knaw.nl/Collections/>,

letzter Zugriff am 21.05.2020) (81) analysiert. Dabei wurden die Sanger-Sequenzen mit den in den Datenbanken enthaltenen Sequenzen verglichen bis die Sequenz mit der größten Übereinstimmung (größten Homologie) gefunden wurde. Anhand der Benennung in der Datenbank konnte somit die Identität der Sanger-Sequenz bestimmt werden.

2.4.2 Analyse von Genom-Sequenzen

Die aus der Nanopore-Sequenzierung erhaltenen Sequenzen, auch Reads genannt, wurden bioinformatisch aufbereitet. Dafür wurden die Rohdaten auf den High Performance Cluster (HPC) der Heinrich-Heine-Universität geladen und dort mittels „basecalling“ bereinigt, sodass nur Reads mit ausreichend guter Qualität weiter prozessiert wurden. Anschließend erfolgte das Demultiplexen, in welchem das Datenpaket nach den jeweiligen spezifischen Barcodes für die Proben aufgetrennt wurde. Beide Arbeitsschritte erfolgten mit der Software Guppy (Version 3.2.4) Es lag anschließend ein Datensatz pro Probe vor, der im Mapping-Schritt mit einer Datenbank aus Referenz-Genomsequenzen abgeglichen wurde. Die Datenbank befindet sich auf dem HPC und die Zusammensetzung dieser Datenbank ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 13).

Tab. 13: Zusammensetzung der Referenz-Datenbank

	Anzahl Referenz-Genome
Archaeen	264
Bakterien	10753
Eukaryoten	2186
Apicomplexa	2
Mikrosporidien	36
Pilze	2146
Wirbeltiere	2
Viren	27827
Viroide	95
Summe	41125

Die erhaltenen Reads wurden mit der Software Kraken (Version 1.1) Organismen in der Datenbank zugeordnet, wodurch sich die Zusammensetzung der Probe ergab.

2.4.3 Statistische Auswertungen

Zur Überprüfung, ob eine Normalverteilung der Rohdaten vorlag, wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Die Überprüfung auf Homogenität der Varianzen wurde anschließend mit dem OneWay-ANOVA-Test durchgeführt. Wenn beide Voraussetzungen erfüllt waren, erfolgte danach die Berechnung ob signifikante Unterschiede in den Daten vorlagen mittels Mann-Whitney-Test oder Chi-Quadrat-Test.

Die Tests wurden unter Verwendung der Programme GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad Software Inc., Kalifornien, USA) und IBM SPSS Statistics Version 26 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt.

2.4.4 Graphische Auswertung

VENN-Diagramme wurden mit der Software Venn Diagram Plotter (Version 1.5.5228.29250) (<https://omics.pnl.gov/software/venn-diagram-plotter>) und Säulendiagramme wurden mit Microsoft Excel 2016 sowie mit GraphPad Prism Version 5.01 erstellt. Unter Verwendung des Programms Genious Pro (Version 5.5.8) wurden multiple Alignments von Pilz-DNA-Sequenzen erzeugt. Abbildungen von PCR-Amplifikationskurven wurden erstellt mithilfe der Bio-Rad CFX Manager Software (Version 3.1.1517.0823).

3. Ergebnisse

3.1 Erhöhung der Ausbeute an Pilz-DNA aus klinischen Proben durch Verbesserung des Pilzaufschlusses

Die etablierte Routinemethode zur DNA-Extraktion aus Pilzzellen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Düsseldorf umfasste zu Beginn meiner experimentellen Arbeiten eine Behandlung der Proben mit Flüssigstickstoff und Proteinase K zur physikalischen und enzymatischen Zellyse. Daran schloss sich eine Guanidiniumhydrochlorid-Behandlung zur chemischen Zellyse und semiautomatischen Isolierung der extrahierten DNA mittels BioRobot EZ1-Workstation an.

Um den Nutzen eines zusätzlichen „Bead beating“-Schrittes zur physikalischen Pilzzellyse zu analysieren, wurden in *in vitro* Experimenten ein klinischer Stamm von *Candida glabrata* (VK 8777) als Vertreter von Hefen sowie ein klinisches Isolat von *Aspergillus fumigatus* (VK 8053) als Vertreter von Schimmelpilzen verwendet. Auf Agar gewachsene Kolonien der Pilze wurden genutzt, um Pilz-Suspensionen herzustellen. Die Pilzsuspensionen wurden anschließend PBS, Blut oder respiratorischem Spülwasser zugesetzt. Suspensionen von *C. glabrata* bestanden ausschließlich aus Konidien, während Suspensionen von *A. fumigatus* aus einer Mischung aus hauptsächlich Konidien und wenigen Hyphen (im Verhältnis 100:1) bestanden. Um bei jedem Experiment Pilz-Suspensionen mit vergleichbarer Anzahl an Pilzzellen zu haben, wurden die optische Dichte der hergestellten Suspensionen mittels OD₆₀₀-Messung gemessen und die Zellzahl in der Neubauer-Kammer ermittelt. Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) als Maß vitaler Pilzzellen wurden die Suspensionen in seriellen Verdünnungen 1/10 bis zu 10⁻⁸ auf Sabouraud Dextrose GC Agar ausplattiert und das spätere Wachstum mit den Messungen von OD₆₀₀ und mikroskopischer Auszählung verglichen. Die nachfolgende Tab. 14 zeigt die Werte für jedes Spike-in-Experiment.

Tab. 14: Mittlere OD₆₀₀-Werte und KBE der eingesetzten Pilzsuspensionen

Pilzsuspension	Spike-in Experiment	OD ₆₀₀ Wert	Zellen/ml (mikroskopische Auszählung)	KBE/ml (gewachsene Kolonien)
<i>C. glabrata</i>	PBS	1,83 ± 1,01	1,80 (±2,09) x10 ⁹	2,26 (±2,79) x10 ⁸
	Respiratorisches Spülwasser	2,34 ± 0,47	1,95 (±1,57) x10 ¹⁰	6,53 (±7,27) x10 ⁸
	Blut	1,85 ± 0,98	4,31 (±5,35) x10 ⁹	1,57 (±1,45) x10 ⁸
<i>A. fumigatus</i>	PBS	1,66 ± 1,14	2,32 (±1,90) x10 ⁸	3,73 (±3,30) x10 ⁷
	Respiratorisches Spülwasser	1,98 ± 1,04	3,33 (±2,66) x10 ⁹	2,97 (±2,83) x10 ⁸
	Blut	1,54 ± 1,26	2,32 (±3,03) x10 ⁹	8,14 (±6,89) x10 ⁷

Es zeigte sich, dass bei ähnlichen OD₆₀₀-Werten (*Candida*: 1,97 ± 0,92); *Aspergillus*: 1,70 ± 1,17) die Anzahl vitaler Pilzzellen (*Candida*: 3,10 (±4,60) x10⁸ KBE; *Aspergillus*: 1,24 (±1,88) x10⁸ KBE) um etwa eine Zehnerpotenz niedriger lagen als die Anzahl der in der Neubauer-Kammer gezählten Pilzzellen (*Candida*: 7,05 (±3,03) x10⁹ Zellen; *Aspergillus*: 1,84 (±2,63) x10⁹ Zellen). Dieser Befund entsprach den Erwartungen, da nicht davon auszugehen war, dass alle Pilzzellen noch vital und somit wachstumsfähig waren.

Für die Ermittlung des besten Aufschlussverfahrens von Pilzzellen wurden in einer ersten Versuchsreihe Pilzsuspensionen in Pufferlösung (PBS) anstelle von Patientenmaterial verwendet. Hierbei konnte durch die alleinige Präsenz der Pilze (in Abwesenheit anderer Zellen des Patientenmaterials) eine Quantifizierung (absolut und relativ) der freigesetzten Pilz-DNA erfolgen (mittels Spektrophotometrie (absolut) und Realtime-PCR (relativ)), und eine Quantifizierung der noch vitalen, nicht-aufgeschlossenen Pilze durch Kultivierung durchgeführt werden.

Das Ziel war die Validierung der Einführung eines „Bead beating“-Schrittes in das Routine-DNA-Extraktionsverfahren für Pilze. Zusätzlich wurde der Einfluss von flüssigem Stickstoff, sowie von Proteinase K auf den Zellaufschluss ermittelt. Dafür wurden die genannten Methoden einzeln oder in Kombination eingesetzt (Abb. 2).

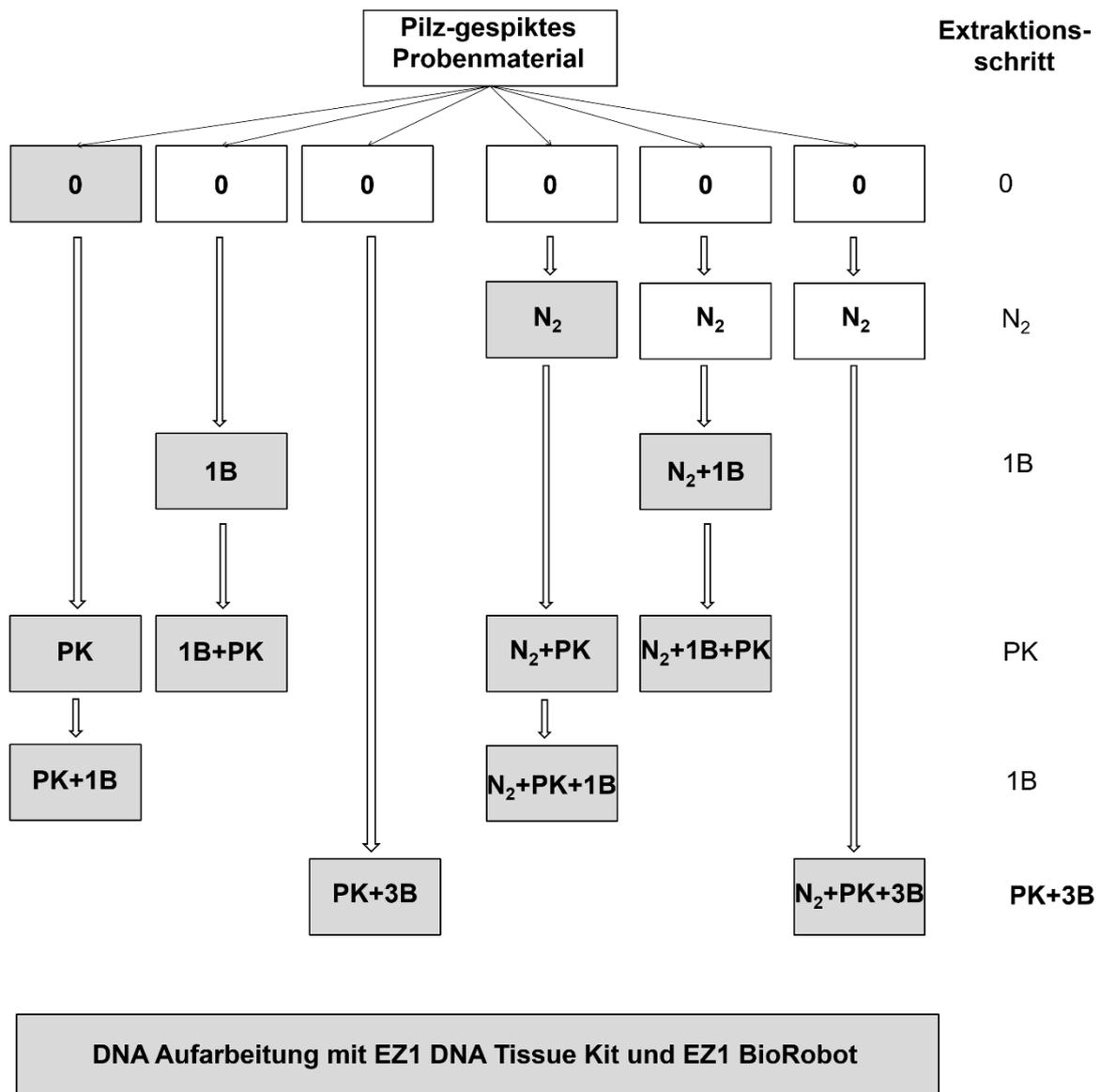


Abb. 2: Schema der Kombination verschiedener DNA-Extraktionsschritte

Aliquots einer Pilz-gespikten Probe (PBS, Blut oder respiratorisches Spülwasser) wurden verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden unterzogen. 0: alleinige Extraktion mit dem EZ1-DNA-Tissue-Kit und dem EZ1 BioRobot; N₂: Flüssigstickstoffbehandlung; 1B: einmaliges „Bead beating“; PK: Proteinase K Lyse; PK+3B: dreifaches „Bead beating“ und gleichzeitiger Proteinase K Lyse. Die DNA der mit grauen Kästen markierten Proben wurden anschließend mittels EZ1-Aufarbeitung aufgereinigt.

Wie in Abb. 2 schematisch dargestellt ist, startete jedes Experiment mit Aliquots einer unbehandelten Pilzsuspension (0). Die eine Hälfte der Aliquots wurde mit flüssigem Stickstoff behandelt (N₂), die andere Hälfte wurde unbehandelt gelassen. Anschließend erfolgte jeder weitere Schritt der Austestung sowohl mit den Stickstoff-

Proben als auch mit den unbehandelten Proben. Die Proben wurden einer enzymatischen Lyse mit Proteinase K unterzogen (PK und N₂+PK) oder durchliefen einen „Bead beating“-Schritt (1B und N₂+1B). Außerdem erfolgten Kombinationen beider Verfahren bei denen die Proteinase K Lyse entweder vor (PK+1B und N₂+PK+1B) oder nach (1B+PK und N₂+1B+PK) dem „Bead beating“ durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde eine vorher unbehandelte Probe (PK+3B) sowie eine Stickstoff-Probe (N₂+PK+3B) mit einer Kombination aus dreifachem „Bead beating“ mit gleichzeitiger Proteinase K Lyse behandelt.

Nach jedem Zwischenschritt wurde ein Teil, der in der Abbildung grau markierten Proben verwendet, um die Menge vitaler Pilze durch Bestimmung der KBE zu ermitteln (siehe Kap. 2.2.2), sowie mittels EZ1 Bioroboter DNA zu isolieren. Dabei wurden alle Proben, auch die Kontrollprobe (0), einer basalen chemischen Zellyse unterzogen. Der Anstieg der freigesetzten DNA-Menge wurde spektrophotometrisch und per fuPCR bestimmt.

Die Probe 0, die weder physikalisch (N₂ oder „Bead beating“) noch enzymatisch (Proteinase K) behandelt worden war und deren DNA nur mittels EZ1-Aufarbeitung aus der ursprünglichen Pilzsuspension aufgereinigt wurde, diente als Referenz für alle Extraktionen ohne Stickstoff-Behandlung, während die Pilzsuspension der Probe N₂, die nur mit Stickstoff vor der EZ1-Aufbereitung behandelt wurde, als Referenz für alle Extraktionen mit Stickstoff-Behandlung verwendet wurde.

3.1.1 Flüssigstickstoff-Behandlung und Proteinase K Aufschluss führt zu keiner Steigerung der DNA-Ausbeute

Zunächst wurde der Effekt der Behandlung mit flüssigem Stickstoff und der Proteinase K Lyse auf die DNA-Freisetzung von *Candida* und *Aspergillus* im Detail untersucht, da die Kombination dieser beiden Schritte vor der semiautomatischen DNA-Präparation mittels EZ1 BioRobot der bisher durchgeführten Extraktionsmethode der Routinediagnostik zur Pilz-DNA-Präparation aus Patientenproben entsprach.

Wie in Abb. 3A zu sehen, war nach der Routineaufbereitung (N₂+PK) kein Wachstum von Pilzen mehr feststellbar. Dies wurde auf die Behandlung mit flüssigem Stickstoff zurückgeführt, da schon nach alleiniger N₂-Behandlung kein Pilzwachstum mehr nachweisbar war, der alleinige Proteinase K Schritt (PK) das Wachstum jedoch nur

reduzierte; von *Candida* um 99,9% und von *Aspergillus* um 94,5%. Diese Daten zeigten, dass eine Behandlung mit flüssigem Stickstoff ein essenzieller Faktor für den Zelltod der Pilze ist.

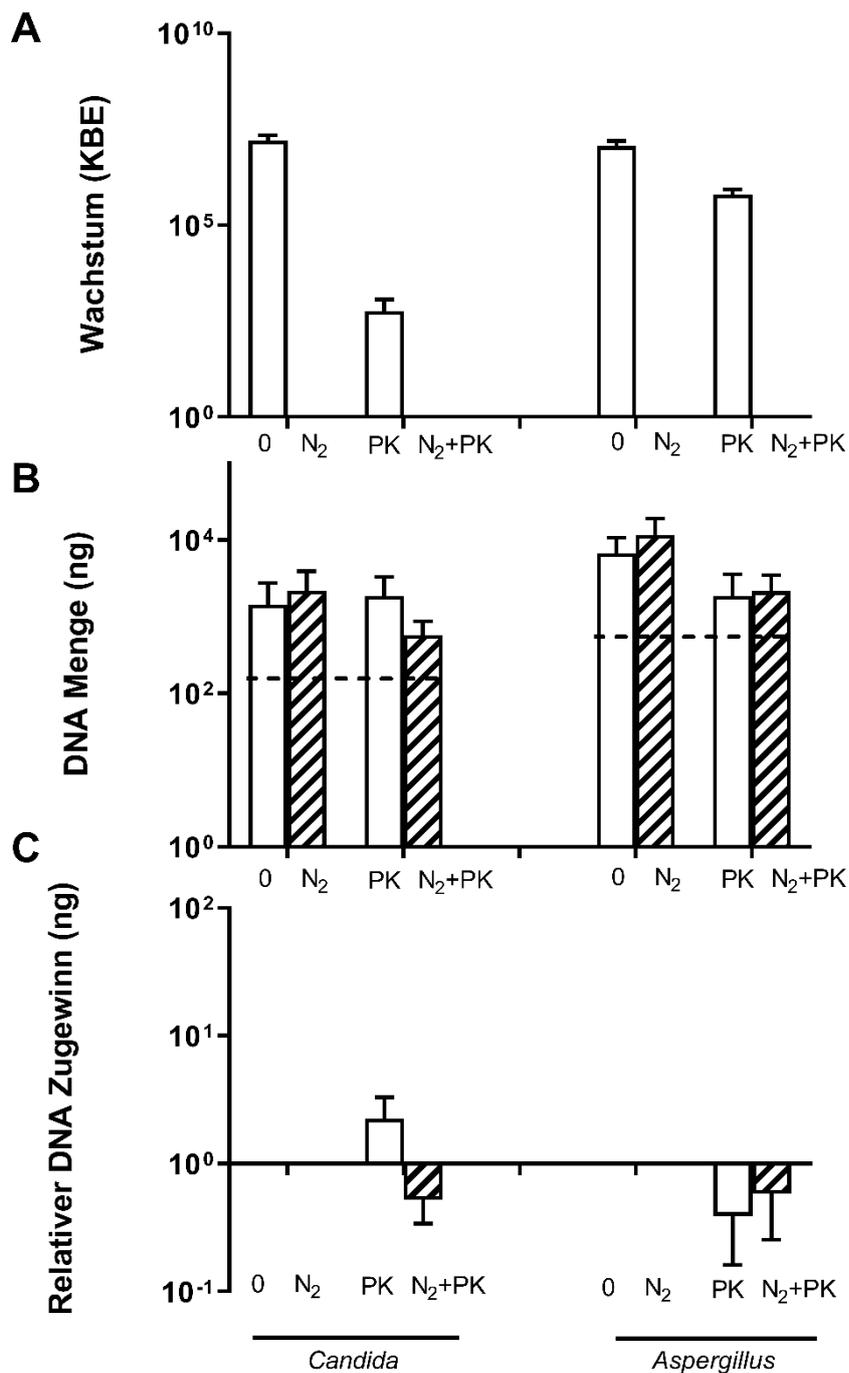


Abb. 3: Einfluss der Behandlung von *Candida* und *Aspergillus* mit flüssigem Stickstoff und/oder Proteinase K auf Wachstum (A), DNA-Menge (B) und DNA-Zugewinn (C)

Aliquots von Pilzsuspensionen in PBS wurden den jeweiligen Extraktionsmethoden, wie in Abb. 2 beschrieben, unterzogen. Das Pilzwachstum (A) sowie die Gesamtmenge der EZ1-gereinigten DNA (B) wurde auf ein Inokulum von 10⁸ Zellen normalisiert. Die gestrichelten Linien markieren die Menge an zellfreier DNA in den Pilzsuspensionen. Die relative DNA-Zunahme wurde mittels PCR bestimmt (C) bezogen auf Referenz 0 für Proben ohne N₂-Behandlung und auf Referenz N₂ für Proben mit N₂-Behandlung getestet. Die Daten sind Mittelwerte (+/- Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Spike-in-Experimenten.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass der Zelltod gleichbedeutend mit Zellwandzerstörung und DNA-Freisetzung ist, wurde DNA aus den PBS-Proben spektrophotometrisch quantifiziert (Abb. 3B). Um auszuschließen, dass die gemessenen DNA-Mengen nicht bereits durch Scherkräfte während der Herstellung der Pilz-Suspensionen, sondern durch die getesteten Extraktionsmethoden aus den Zellen freigesetzt wurden, wurde die freie DNA in den unbehandelten Ausgangs-Suspensionen durch Zentrifugation der intakten Pilzzellen von diesen getrennt und spektrophotometrisch quantifiziert. In Abb. 3B markiert die gestrichelten Linien, die die gemessene Menge an zellfreier Pilz-DNA. Die absolute Menge zellfreier DNA war bei *Candida* ($1,4 (\pm 0,3) \times 10^2$ ng bezogen auf ein Inokulum von 10^8 Zellen) geringer als bei *Aspergillus* ($7,1 (\pm 0,8) \times 10^2$ ng pro 10^8 Zellen). Allerdings war die DNA-Menge, die sich mittels basaler EZ1-Lyse (Probe 0) freisetzen ließ bei *Aspergillus* auch größer als bei *Candida*, sodass die Menge zellfreier DNA bei beiden Pilzen 10% der gesamten DNA-Menge der Probe 0 entsprach. 90% der gemessenen DNA wurde demnach durch die getesteten DNA-Extraktionsmethoden freigesetzt. Aus *Candida*-Suspensionen konnten mit basaler EZ1-Lyse (0) $5,7 (\pm 2,9) \times 10^2$ ng DNA pro 10^8 Zellen freigesetzt werden. Die Behandlung der Probe mit flüssigem Stickstoff (N_2) sorgte für eine geringe Steigerung auf $1,4 (\pm 1,3) \times 10^3$ ng DNA pro 10^8 Zellen. Für *Aspergillus*-Suspensionen waren die freigesetzten DNA-Mengen höher als bei *Candida*. Im Vergleich beider Extraktionsmethoden verhielt es sich aber wie bereits oben beschrieben: die freigesetzte DNA-Menge aus Probe 0 ($2,2 (\pm 1,3) \times 10^3$ ng DNA pro 10^8 Zellen) war etwas geringer als aus Probe N_2 ($6,7 (\pm 4) \times 10^3$ ng pro 10^8 Zellen).

Um zu ermitteln, ob eine anschließender Proteinase K Behandlung die DNA-Ausbeute steigert, wurde der relative DNA-Zugewinn berechnet (Abb. 3C). Damit die extrahierte Menge an Pilz-DNA unabhängig von möglicher weiterer DNA in den Suspensionen analysiert werden konnte, wurde sie per Realtime-fuPCR amplifiziert. Zur relativen Quantifizierung der PCR-Ergebnisse wurden $2^{-\Delta CT}$ -Werte berechnet und als x-fache Differenz zur Referenz (Probe 0 als Referenz für Proben ohne N_2 -Behandlung und Probe N_2 für Proben mit N_2 -Behandlung) angegeben. Wie in Abb. 3C zu erkennen ist, korrelierten die relativen DNA-Zunahmen mit den spektrophotometrisch gemessenen DNA-Mengen-Veränderungen. Daher war es möglich bei den weiteren Austestungen auf die spektrophotometrischen DNA-Messungen zugunsten der fuPCR-Auswertung zu verzichten. Von Relevanz ist das für die Austestung in Patientenmaterialien, wie

Blut oder respiratorischer Spülflüssigkeit, weil hier die enthaltene humane DNA die spektrophotometrische Messung verfälschen würde.

Die alleinige Proteinase K Behandlung (PK) bei *Candida*-Suspensionen führte zu einer geringen (5-fachen) Erhöhung der Pilz-DNA-Freisetzung verglichen mit Probe 0. Proteinase K Lyse nach Stickstoff-Behandlung (N₂+PK) hingegen führte zu keiner DNA-Zunahme. Bei den *Aspergillus*-Suspensionen verringert die alleinige Proteinase K Lyse (PK) sogar die freigesetzte DNA-Menge bezogen auf Probe 0, während PK-Behandlung nach Stickstoff (N₂+PK) wie bei *Candida* keinen Einfluss auf die DNA-Freisetzung hatte. Es zeigt sich deutlich, dass keine der beiden getesteten Methoden zu einem statistisch signifikanten Zuwachs der extrahierten (Pilz)- DNA-Menge führte.

3.1.2 Steigerung der fungalen DNA-Ausbeute durch die Einführung des „Bead beating“ Schrittes

Als nächstes wurde nun untersucht, ob ein zusätzlichen „Bead beating“ Schritt mit oder ohne vorhergehende Behandlung mit flüssigem Stickstoff zu einer verbesserten Lyse der Pilzzellen und DNA-Freisetzung führt.

Die Einführung eines „Bead beating“ Schrittes führte bei beiden Pilzen zu einer erhöhten Freisetzung an Pilz-DNA-Menge, unabhängig davon, ob das einfache „Bead beating“ alleine (1B) oder in Kombination mit einem vorhergehenden (PK+1B) oder nachfolgender (1B+PK) Proteinase K Lyse durchgeführt wurde oder die Probe mit dreifachem „Bead beating“ und gleichzeitiger Proteinase K Behandlung (PK+3B) bearbeitet wurde (siehe Abb. 4)

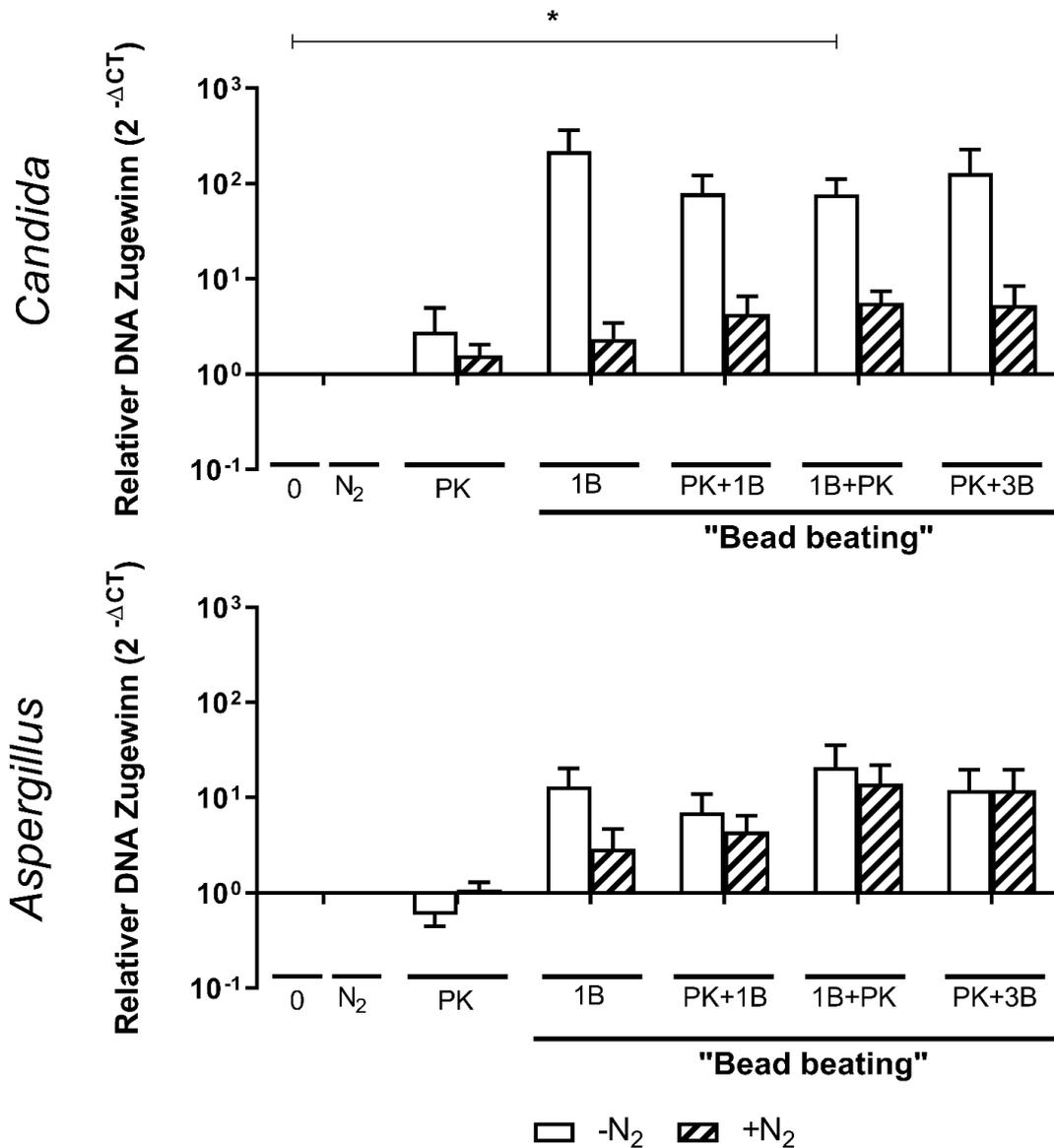


Abb. 4: Einfluss des „Bead beatings“ auf die fungale DNA-Freisetzung

Aliquots von Pilzsuspensionen in PBS wurden den jeweiligen Extraktionsmethoden, wie in Abb. 2 beschrieben, unterzogen. Die DNA aller Proben wurde mittels EZ1-Roboter aufgereinigt, durch fuPCR amplifiziert und die relative DNA-Menge durch 2^{-ΔCT}-Werte als x-fach Steigerung zur Referenz 0 für Proben ohne N₂-Behandlung und N₂ für Proben mit N₂-Behandlung berechnet (*, p-Wert < 0,05). Die Daten sind Mittelwerte (+/- Standardfehler des Mittelwertes) von fünf (*Candida*) und vier (*Aspergillus*) unabhängigen Spike-in-Experimenten.

Bei *Candida*-Suspensionen war bei allen Aufarbeitungsvarianten die DNA-Ausbeute um das 100-fache höher als in der Referenzprobe 0. Obwohl dieser Effekt bei *Aspergillus* weniger stark ausgeprägt war, erhöhte das „Bead beating“ auch hier die DNA-Freisetzung (um das 10-fache bezogen auf die Referenzprobe 0).

Die Erhöhung der DNA-Freisetzung durch einmaliges „Bead beating“ mit nachfolgender Proteinase K Lyse (1B+PK) für *Candida*-Suspensionen war statistisch signifikant, was mit dem Mann-Whitney-Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$) gezeigt werden konnte. Aufgrund der Streuung der Daten aus den vier (*Aspergillus*) bzw. fünf (*Candida*) unabhängigen Messreihen erreichten die anderen „Bead beating“-Methoden trotz sichtbarer Steigerung der freigesetzten DNA-Menge keine statistische Signifikanz. Dennoch zeigen diese Daten deutlich, dass ein mechanisches Aufbrechen der Zellwand eine erfolgreiche Methode ist, um die Menge der Pilz-DNA bei der Extraktion von Hefen und Schimmelpilzen zu steigern. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Frequenz des „Bead beatings“ die Qualität der extrahierten DNA aufgrund von Fragmentierung/Degradation beeinflusst und dies Auswirkungen auf die PCR-Amplifikationseffizienz hat.

3.1.3 Fragmentierung der DNA durch „Bead beating“

Um den Einfluss des „Bead beatings“ auf die DNA-Fragmentlänge zu bestimmen, wurden die DNA aus Präparationen ohne Flüssigstickstoff-Behandlung einer Fragmentlängenanalyse unterzogen (Abb. 5) Dabei wurden die mittleren DNA-Fragmentlängen (Abb. 5A1 und B1) als auch das Spektrum der Fragmentlängen in den Proben analysiert. Repräsentative Gelbilder sind in Abb. 5A2 und 5B2 dargestellt.

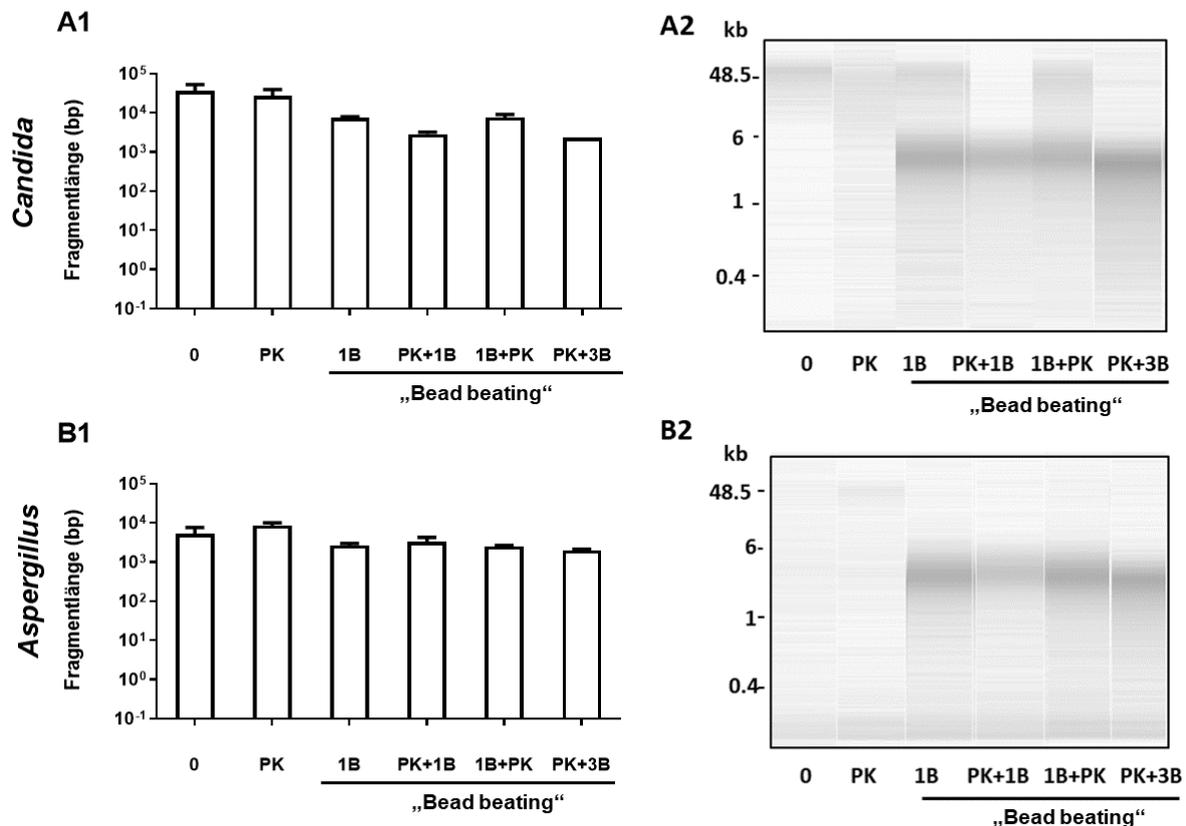


Abb. 5: Fragmentlängen der extrahierten genomischen *Candida* (A) und *Aspergillus* (B) DNA

DNA-Präparationen ohne N₂-Behandlung wurden einer Fragmentlängen-Analyse unterzogen. Die Benennung der Proben entspricht Abb. 2. Die mittleren Fragmentlängen wurden für einen Bereich von 0,05 bis 150 kb (A1 und B1) berechnet. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte (+/- Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Spike-in-Experimenten. Gezeigt sind Gelbilder der DNA-Fragmentmuster eines repräsentativen Versuchs (A2 und B2).

Es zeigte sich, dass „Bead beating“ generell die DNA-Fragmentlänge im Vergleich zu Suspensionen, die nur mit dem EZ1-Aufschluss mit oder ohne Proteinase K Lyse behandelt wurden (Proben 0 und PK), verringerte. Dreifaches „Bead beating“ (PK+3B) führte zu den kürzesten mittleren Fragmentlängen von ca. 2 kb, während diese bei einfachem „Bead beating“ (1B, PK+1B und 1B+PK) ca. 4 kb betragen.

Bei *Candida*-Proben (Abb. 6A2) lag vor dem „Bead beating“ die mittlere Fragmentlänge der hochmolekularen DNA bei 60 kb und ihr Anteil in der Probe zwischen 70 und 90% der Gesamt-DNA (97% in Probe 0 und 72% in Probe PK). Nach dem „Bead beating“ waren nur noch sehr geringe Mengen an hochmolekularer DNA

(mit einer kürzeren mittleren Fragmentlänge von 40 kb) vorhanden (15% der Gesamt-DNA in Probe 1B und 18,5% der Gesamt-DNA in Probe 1B+PK). Wie das Gelbild zeigt, (Abb. 6A2) hatte die Mehrheit der DNA-Fragmente (71% der gesamten freigesetzten DNA) nach dem „Bead beating“ Längen zwischen 1 und 6 kb. Nach dreifachem „Bead beating“ (PK+3B) war hier deutlich der Verlust der hochmolekularen Fraktion zu erkennen, mit gleichzeitigem Anstieg der Menge an Fragmenten die kürzer als 1 kb waren (27% der gesamten freigesetzten DNA).

Bei den *Aspergillus*-Proben ließ sich nach keiner der getesteten Aufschlussmethoden hochmolekulare *Aspergillus*-DNA-Fragmente mit mittleren Fragmentlängen von 60kb oder größer detektieren. Allerdings zeigte sich im Gelbild, dass der Anteil von DNA-Fragmenten mit Längen zwischen 1 und 6 kb niedriger war als bei *Candida* (65% bezogen auf die gesamte freigesetzte DNA). Das wurde als Hinweis auf eine erschwerte Lyse der *Aspergillus*-Zellwand gewertet. Aufgrund des langsameren Aufschlusses verglichen mit *Candida* sollte die DNA von *Aspergillus* deshalb länger vor Fragmentierung geschützt sein.

3.1.4 Matrixeffekte bei klinischem Probenmaterial erschweren die DNA-Freisetzung

Nach dem Befund, dass das „Bead beating“ von Pilzen in PBS-Puffer die Fragmentlänge der extrahierten Pilz-DNA verringerte, sollte anschließend geklärt werden, ob dieser Effekt auch beim Aufschluss der Pilze aus Patientenmaterial auftrat.

Daher wurden respiratorisches Spülwasser und Blutproben gesunder Probanden, die zuvor pilznegativ getestet worden waren, mit Suspensionen von *C. glabrata* und *A. fumigatus* versetzt (gespikt) und analog zur ersten Testreihe mittels verschiedener Extraktionsschritte behandelt. Die DNA-Freisetzung wurde dann wie zuvor beschrieben (siehe 3.1.1) mittels fuPCR quantifiziert (Abb. 6).

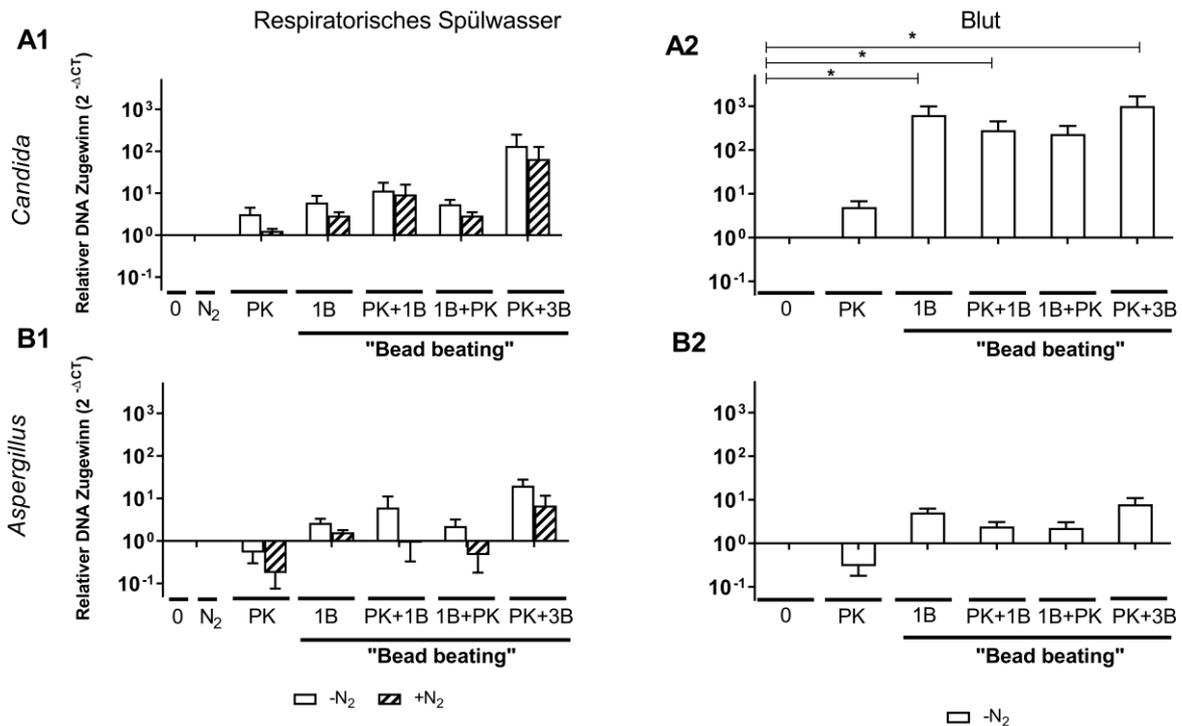


Abb. 6: Matrix-Effekt von respiratorischen und Blut-Proben auf die fungale DNA-Freisetzung

Aliquots von Pilzsuspensionen in respiratorischem Spülwasser und Blut wurden den jeweiligen Extraktionsmethoden wie in Abb. 2 beschrieben unterzogen. Die DNA aller Proben wurde mittels EZ1-Roboter aufgereinigt, durch fuPCR amplifiziert und die relativen DNA-Mengen wurden berechnet, wie in Abb. 4 beschrieben. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte (+/- Standardfehler des Mittelwertes) von drei (respiratorisches Spülwasser) und vier (Blut) unabhängigen Spike-in-Experimenten.

Respiratorisches Spülwasser zeigte sowohl für den Aufschluss von *C. glabrata* als auch *A. fumigatus* einen deutlichen Matrixeffekt (Abb. 6A1 und B1). Matrixeffekte resultieren aus Wechselwirkungen von Komponenten der Proben mit Komponenten der analytischen Pipeline und können die Effektivität der DNA-Extraktion verringern. Wie schon bei den vorherigen Testungen in PBS beobachtet, erzielten Präparationen ohne Flüssigstickstoff-Behandlung eine höhere DNA-Freisetzung als Präparationen mit Stickstoff. Im Gegensatz zu den Pilzaufschlüssen in PBS ergab jedoch einfaches „Bead beating“ gefolgt von Proteinase K Lyse eine deutlich geringere DNA-Ausbeute (1/10), während das dreifache „Bead beating“ zu einem vergleichbar hohen DNA-Anstieg führte; 135-fach für *Candida* (PK+3B) und 20-fach für *Aspergillus* (PK+3B).

Anschließend wurde der Matrixeffekt von Blut auf die Effizienz der Pilz-DNA-Präparation getestet. Auf die Behandlung mit flüssigem Stickstoff wurde aufgrund der

beobachteten Gerinnung des Blutes und folglich Verklumpung der gespikten Blutproben verzichtet. Die Ergebnisse waren qualitativ sehr ähnlich zu denen aus PBS (Abb. 6A2 und B2), führten aber zu einer höheren DNA-Freisetzung aus *Candida*-gespiktem Blut im Vergleich zu *Candida*-gespiktem PBS

Bei der DNA-Extraktion aus Patientenmaterial führte das dreifache „Bead beating“ zu höheren DNA-Ausbeuten als einfaches „Bead beating“, was sich in vorherigen Testungen in PBS nicht gezeigt hatte und mehrfaches „Bead beating“ dort sogar zu einer Fragmentierung der DNA führte. Die Vermutung lag nahe, dass Bestandteile des Patientenmaterials den Aufschluss erschwerten bzw. verlangsamten und die DNA vor Degradation schützten. Somit war mehrfaches „Bead beating“ notwendig, um größere Mengen DNA freizusetzen, ohne dass diese dabei degradiert wurde. Damit lässt sich eine klare Empfehlung für die Einführung eines dreifachen „Bead beating“ Schrittes in die bisher bestehende Routine-DNA-Präparation für die DNA-Extraktion aus Hefen und Schimmelpilzen in humanen diagnostischen Probenmaterialien aussprechen.

3.2 Klinische Anwendung der fuPCR unter Nutzung der verbesserten DNA-Präparation

Die um das „Bead beating“ verbesserte Methode zur Extraktion fungaler DNA aus Patientenproben wurde nun genutzt, um im Rahmen einer klinischen Studie die diagnostische Eignung der Extraktionsmethode in der fuPCR zu evaluieren. Dafür wurden die Ergebnisse des fuPCR-basierten Pilznachweises in respiratorischen Proben und Blutproben von hämatologischen Patienten mit den kulturell und serologisch gewonnenen Daten verglichen.

In die Studie eingeschlossen wurden 94 Patienten und 40 Kontrollprobanden. 89% (n= 83/94) der Patienten hatten eine der vier folgenden Grunderkrankungen (siehe Tab. 15): Myelodysplastisches Syndrom mit Blastenvermehrung (MDS EB2) (n=10), Akute myeloische Leukämie (AML) (n=40), Akute lymphatische Leukämie (ALL) (n=13) oder Multiples Myelom (MM) (n=20). 11 Patienten hatten andere, seltenere Erkrankungen, wie Chronische myeloische Leukämie (CML) (n=1), Chronische lymphatische Leukämie (CLL) (n=1), Osteomyelofibrose (OMF) (n=2), Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) (n=3), Progressive chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) (n=1) oder Hodenkrebs (n=3).

Tab. 15: Charakteristika der Studienkohorte

		Hämatologische Patienten	Kontrollprobanden
		Anzahl und (Anteil in %) ¹	Anzahl und (Anteil in %) ¹
Alter in Jahren		56 ± 14	48 ± 13
Geschlecht / Alter	Frauen	35 (37) / 53 ± 14	27 (67) / 48 ± 12
	Männer	59 (63) / 57 ± 14	13 (33) / 46 ± 16
Grunderkrankung	MDS EB2	10 (11)	0 (0)
	AML	40 (43)	0 (0)
	ALL	13 (14)	0 (0)
	MM	20 (21)	0 (0)
	CML	1 (1)	0 (0)
	CLL	1 (1)	0 (0)
	OMF	2 (2)	0 (0)
	NHL	3 (3)	0 (0)
	CMMML	1 (1)	0 (0)
	Hodenkrebs	3 (3)	0 (0)

¹ In Klammern ist der Anteil in Prozent angegeben bezogen auf die Gesamtzahl der Individuen (Patienten (n = 94); Kontrollprobanden (n = 40))

Das mittlere Alter der Patienten betrug 56 ± 14 Jahre. 37% (35/94) der Patienten waren weiblich mit einem Durchschnittsalter von 53 ± 14 Jahren, und 63% (59/94) waren männlich mit einem Durchschnittsalter von 57 ± 14 Jahren. 40 gesunde Personen mit einem Durchschnittsalter von 48 ± 13 Jahren wurden im gleichen Zeitintervall als Kontrollgruppe rekrutiert. Davon waren 67% (27/40) weiblich (mittleres Alter 48 ± 12 Jahre) und 33% (13/40) männlich (mittleres Alter 46 ± 16 Jahre). Hämatologische Patienten und Kontrollprobanden unterschieden sich nicht demnach nicht signifikant in ihrer Altersstruktur und waren somit vergleichbar.

Von jedem Studienteilnehmer (Patienten und Probanden) wurde ein Probenset bestehend aus vier verschiedenen Probenmaterialien gewonnen (respiratorisches Spülwasser, EDTA-antikoaguliertes Vollblut, Blutserum und Blutplasma). Von 35% (33/94) der Patienten und einer gesunden Person wurde mehr als ein Probensatz entnommen, so dass insgesamt 152 Probensets von 94 Patienten und 41 Probensets von 40 gesunden Personen in der Studie analysiert wurden. Wie in Tab. 16 zusammengefasst, wurden die Proben der hämatologischen Patienten bezogen auf den Zeitpunkt der Entnahme im Regime der Stammzelltransplantation in zwei Gruppen unterteilt.

Tab. 16: Therapiestatus bei Zeitpunkt der Probennahme

Therapie-Status bei Probennahme	Gruppe	Proben von hämatologischen Patienten Anzahl und (Anteil in %) ¹
Erstinduktion	1	61 (40)
Konsolidierung		14 (9)
Erhaltungstherapie		4 (3)
Autologe Stammzelltransplantation	2	19 (13)
Allogene Stammzelltransplantation		54 (36)

¹ In Klammern ist der Anteil in Prozent angegeben bezogen auf die Gesamtzahl der Proben (n = 152)

Gruppe 1 enthielt die Proben, die vor Beginn der Konditionierung für die Stammzelltransplantation entnommen wurden (Erstinduktion, Konsolidierung, Erhaltungstherapie; n=79), Gruppe 2 die Proben nach Beginn der Konditionierung (autologe und allogene Stammzelltransplantation; n=73). Bei mehrfach beprobten Patienten war ungefähr die Hälfte der Proben jedes Patienten Gruppe 1 (79/152) und die andere Hälfte Gruppe 2 (73/152) zuzuordnen.

Genomische DNA wurde aus respiratorischem Spülwasser, Vollblut, Serum und Plasma mit der verbesserten Zellyse-Methode extrahiert (Kapitel 3.1) und anschließend per fuPCR analysiert. Die bei jeder fuPCR mitgeführte Negativ-Kontrolle fiel in allen Fällen negativ aus, wodurch eine Kontamination des PCR-Mixes ausgeschlossen werden konnte.

Um eine Inhibition der fuPCR und somit falsch-negative Ergebnisse ausschließen zu können, wurden sämtliche Proben mittels Gap-PCR geprüft. Der Nachweis des in humanen Zellen vorkommenden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Gens mittels Gap-PCR, ist ein in der Routine-Diagnostik etabliertes Verfahren für die Bestimmung der Güte klinischer Proben. Das GAPDH-Gen kommt im menschlichen Genom nur einmal vor. Per Gap-PCR konnte die Quantität des GAPDH-Gens in den Patientenproben bestimmt werden und somit auf die Anzahl humaner Zellen (Genomäquivalente) in der Probe geschlossen werden. Zeigte sich hier keine Amplifikation vor dem 30. Zyklus, was dem Nachweis von ca. 1000 humanen Zellen entsprach, konnte dies auf PCR-Inhibitoren oder eine schlechte Probengüte hinweisen.

Zusätzlich wurde die interne Kontroll-PCR (IK) durchgeführt. Der PCR-Mix der IK-PCR enthielt ein Plasmid in niedriger Konzentration ($2,5 \times 10^2$ Kopien pro PCR Ansatz), dessen Nachweis in der IK-PCR im 33. – 38. Zyklus positiv werden sollte. Wurde die IK-PCR jedoch erst nach Zyklus 39 positiv, musste vom Vorliegen von PCR-Inhibitoren in der Probe ausgegangen werden.

Mindestens eins der beiden Kriterien (Gap-PCR vor dem 30. Zyklus positiv oder IK-PCR vor dem 39. Zyklus positiv) musste erfüllt sein, damit die Inhibition der fuPCR für die Proben ausgeschlossen werden konnte. Es zeigte sich, dass ein Teil der Proben negativ in der IK-PCR ausfiel (siehe Tab. 17). Bei den Patienten betraf dies 18 (12%) der respiratorischen, 10 (7%) der Blut-, 16 (11%) der Serum- und 18 (12%) der Plasma-Proben. Bei den Kontrollprobanden lediglich 1 (2%) der respiratorischen Proben.

Tab. 17: Ergebnisse aus IK- und Gap-PCR für Proben von Patienten und Kontrollprobanden

Patienten		Anzahl Proben n (%) ¹	Mittlerer CT-Wert IK-PCR	Mittlerer CT-Wert Gap-PCR	Mittlere Zahl Gap- Genomäquivalente
Respiratorisches Spülwasser	IK positiv	134 (88)	36 ± 1	22 ± 2	2,69 (±4,42) x10 ⁵
	IK negativ	18 (12)	-	22 ± 2	2,88 (±3,61) x10 ⁵
EDTA Blut	IK positiv	142 (93)	35 ± 1	21 ± 3	3,97 (±3,89) x10 ⁵
	IK negativ	10 (7)	-	21 ± 1	3,70 (±2,99) x10 ⁵
Serum	IK positiv	136 (89)	36 ± 2	28 ± 3	1,62 (±3,45) x10 ⁴
	IK negativ	16 (11)	-	27 ± 2	1,20 (±1,12) x10 ⁴
Plasma	IK positiv	134 (88)	35 ± 1	29 ± 2	1,47 (±7,53) x10 ⁴
	IK negativ	18 (12)	-	29 ± 3	1,01 (±1,26) x10 ⁴
Kontrollprobanden					
Respiratorisches Spülwasser	IK positiv	40 (98)	34 ± 1	23 ± 2	8,24 (±1,53) x10 ⁵
	IK negativ	1 (2)	-	24	5,57 x10 ³
EDTA Blut	IK positiv	41 (100)	34 ± 1	20 ± 1	2,41 (±1,93) x10 ⁵
	IK negativ	0 (0)	-	-	-
Serum	IK positiv	41 (100)	34 ± 1	29 ± 2	2,60 (±7,70) x10 ³
	IK negativ	0 (0)	-	-	-
Plasma	IK positiv	41 (100)	34 ± 1	30 ± 3	2,27 (±7,78) x10 ³
	IK negativ	0 (0)	-	-	-

¹ In Klammern ist der prozentuale Anteil pro Probenmaterial angegeben

In 16 der 62 IK-negativen Proben ließen sich allerdings trotzdem Pilze per fuPCR nachweisen. Zusätzlich waren sämtliche IK-negativen Proben positiv vor dem 30.

Zyklus in der Gap-PCR. Dadurch ließ sich eine Inhibition der PCR und somit falsch negative Ergebnisse ausschließen und wies eher darauf hin, dass die IK-PCR in diesen Fällen falsch-negativ war, was sich möglicherweise durch eine Degradation des IK-Plasmids erklären lässt, welches in der Folge nicht mehr per fuPCR detektiert werden konnte.

Eine Reaktion des fuPCR wurde als positiv bewertet, wenn sie einen CT-Wert < 35 Zyklen aufwies. Da aufgrund des unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes SYBRGreen neben dem gewünschten Amplifikat auch Primerdimere detektiert wurde, konnten „echte“ PCR-Produkte mittels Schmelzpunktanalyse identifiziert werden. Pilz-PCR-Produkt wiesen Schmelzpunkte von ≥ 78 °C auf, wohingegen Primerdimere Schmelzpunkte von < 78 °C (meist 75-76 °C) aufwiesen. Proben, die in der fuPCR Reaktion G positiv waren, wurden anschließend in speziesspezifischen TaqMan-PCRs für den Nachweis von *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* und *C. krusei* analysiert (51, 77). Die PCR-Produkte von Proben, die zwar positiv in Reaktion G, aber negativ in den speziesspezifischen TaqMan-PCRs negativ ausfielen (z.B. Pilze der Gattung *Cladosporium*), sowie PCR-Produkte der fuPCR Reaktionen A bis F wurden Sangersequenziert und die Pilzspezies anschließend per BLAST-Analyse identifiziert.

Die Identifizierung der Pilzspezies durch Homologievergleich der Sanger-Sequenz mit Sequenzen der Datenbanken wurde als valide bewertet, wenn die homologe Sequenz einen minimalen „Query“ (Prozentsatz der Gesamtlänge der Sequenz, die mit der Sequenz der Datenbank aligniert wurde) von $> 65\%$ und eine „Identity“ (Prozentsatz der Identität zwischen Amplifikat-Sequenz und der Sequenz der Datenbank) von $> 70\%$ in mindestens 2 von 3 Suchalgorithmen (blastn, megablast, CBS) hatte. 97% (90/93) der Sequenzen hatten einen „Query“ von $\geq 95\%$ und 96% (89/93) der Sequenzen eine „Identity“ von $\geq 95\%$. In den Fällen, in denen die Werte unter 95% lagen (4/93), wurde der Pilz nur auf Gattungsebene identifiziert. 46 Pilze wurden ebenfalls nur auf Gattungsebene identifiziert, da ihre Sequenzen zu verschiedenen Pilzspezies mit gleichem Ähnlichkeitsscore homolog waren. Die Kombination aus positiver fuPCR-Reaktion mit anschließender Bestimmung der Pilz-Spezies durch Analyse der Sanger-Sequenz in der Blast-Analyse oder durch Identifizierung in speziesspezifischer TaqMan-PCR wird im Folgenden der Einfachheit halber immer als fuPCR-Assay bezeichnet.

3.2.1 Die fuPCR erweitert das Spektrum der nachgewiesenen Pilze um kulturell nicht detektierte Gattungen wie *Trichosporon*, *Cryptococcus* und *Fusarium*

Basierend auf dem in Kap. 3.2 entwickelten Auswertungsalgorithmus wurden als erstes die respiratorischen Spülwasser-Proben der Patienten und Kontrollprobanden mittels fuPCR-Assay analysiert und mit den kulturellen Ergebnissen verglichen. Im respiratorischen Spülwasser der Patienten konnte bei 71% der Proben (n=108/152) ein positiver Pilznachweis in der Kultur und/oder mit dem fuPCR-Assay erbracht werden. Im Vergleich dazu waren bei den gesunden Probanden nur 37% der Proben (n=15/41) pilzpositiv. In 26% der Patientenproben (40/152) wurden zwei (32/152), drei (5/152), vier (2/152) oder fünf (1/152) verschiedene Pilzspezies gefunden. In der Kontrollgruppe betrug der Anteil an Mehrfachdetektionen lediglich 2% (1/41). Insgesamt wurden 149 Pilze in den 108 Patientenproben nachgewiesen gegenüber von nur 14 Pilzen in 15 Proben der gesunden Probanden (siehe Abb. 7).

Betrachtet man zuerst die Proben, die ausschließlich in der Kultur positiv waren (weiß gefüllter Kreis), zeigt sich, dass der Anteil in den Patientenproben (Abb. 7A; 35% (n=53/152 Proben)) höher war als in der Kontrollgruppe (Abb. 7B; 20% (n=8/41 Proben)).

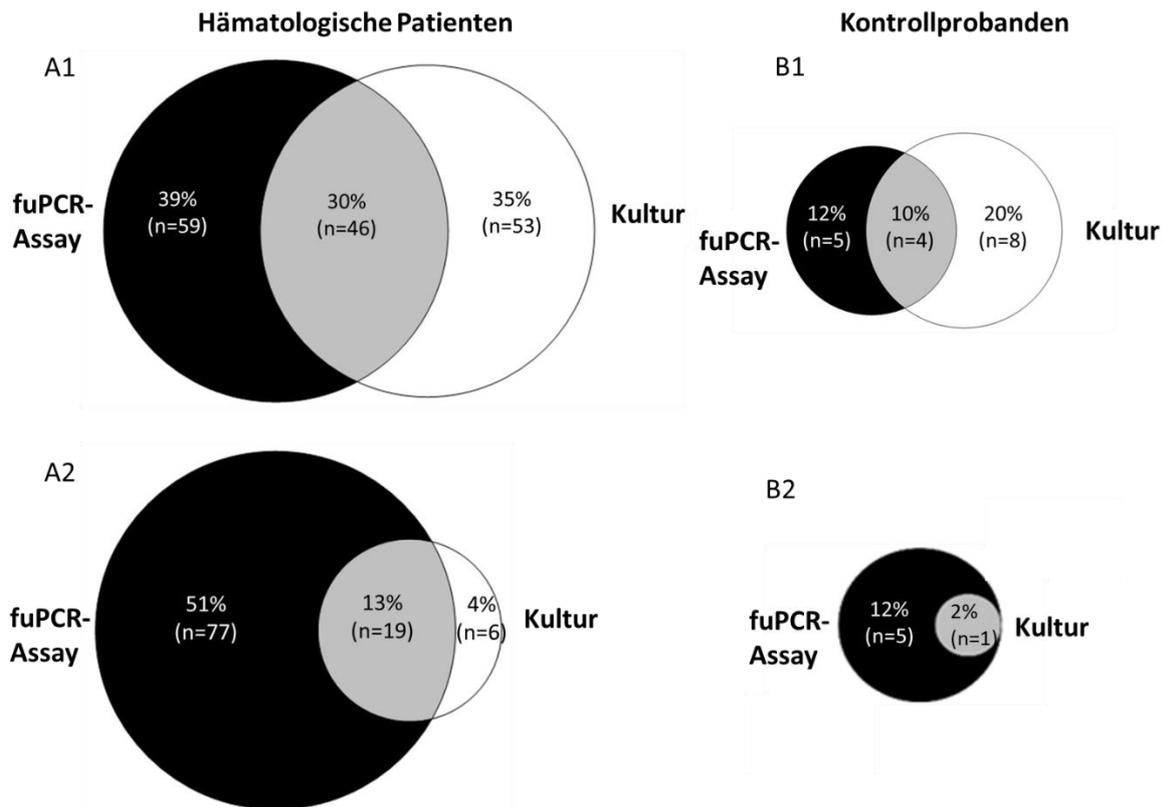


Abb. 7: VENN-Diagramm des prozentualen Anteils der in respiratorischem Spülwasser mittels fuPCR-Assay und Kultur nachgewiesenen Pilze

Proben von hämatologischen Patienten (n=152) (A1-2) und Kontrollen (n=41) (B1-2) wurden mittels fuPCR-Assay (schwarz) und Kultur (weiß) analysiert. Die Detektion durch beide Methoden ist als Überlappung (grau) dargestellt. Für die Auswertung der Kultur wurde ein Cut-off verwendet, bei dem entweder Proben mit mindestens 1 Kolonie/Platte (A1, B1) oder mit mehr als 2 Kolonien/Platte (A2, B2) als positive Nachweise definiert wurden. Die Kreisgröße entspricht dem prozentualen Anteil der detektierten Pilze bezogen auf die Anzahl der Proben. Die Anzahl der detektierten Pilze ist in Klammern angegeben.

Zum Ausschluss einer basalen Kolonisierung wurden anschließend nur Pilz-Kulturen mit mehr als 2 Kolonien/Platte als positiv bewertet (Abb. 7 A2 und B2). Dabei zeigte sich, dass sich die Zahl der kulturellen Pilznachweise bei den Patienten mehr verringerte (um 31%) als bei den Kontrollprobanden (um 20%), was für eine eher basale Besiedlung des Respirationstraktes der Patienten im Gegensatz zu den Gesunden spricht.

Ungefähr die Hälfte der Patientenproben, die mittels Kultur positiv getestet wurden (46/99), waren auch in der fuPCR positiv (Abb. 7; grauer Überlappungsbereich der beiden Kreise). Dieser Anteil betrug bei der Kontrollgruppe nur ein Drittel (4/12). Der Nachweis von Pilzen allein mittels fuPCR-Assay (schwarzer Kreis) führte dazu, dass

in zusätzlich 40% (59/152) der Patientenproben ein Pilzbefund festgestellt werden konnte. Bei den Kontrollprobanden betrug der Anteil der zusätzlichen Detektionen durch den fuPCR-Assay lediglich 12% (5/41). Der fuPCR-Assay lieferte demnach ein „Add-on“ zur Kultur, dass bei den Patienten zu deutlich mehr Pilznachweisen führte als bei den Gesunden.

Bei Betrachtung der detektierten Pilzspezies wurden deutlich, dass in beiden Studiengruppen die häufigste detektierte Pilzgattungen *Candida* war (n = 113 von 158 Pilzen bei den Patienten und 13 von 17 Pilzen in der Kontrollgruppe; siehe Abb. 8).

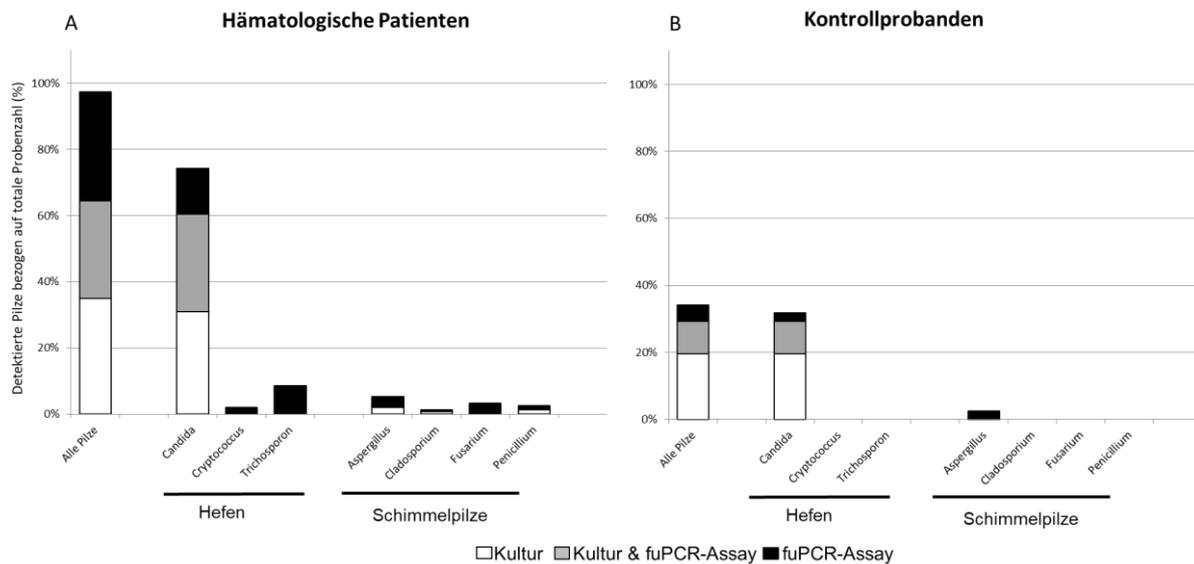


Abb. 8: Im respiratorischen Spülwasser nachgewiesene Pilzgattungen

Der Prozentsatz der nachgewiesenen Pilze, durch Kultur (weiß) und fuPCR-Assay (schwarz), in Proben von hämatologischen Patienten (n=152) (A) und gesunden Personen (n=41) (B) ist als Balkendiagramme dargestellt. Der gleichzeitige Nachweis mit beiden Methoden ist in grau dargestellt.

Candida machte fast den gesamten Anteil der ausschließlich mittels Kultur detektierten Pilzgattung aus (Abb. 8, weiße Balkensegmente). 47 von 53 per Kultur detektierte Pilze in den Patientenproben und 8 von 8 bei den Kontrollprobanden waren *Candida*. Im Gegensatz dazu wurden Pilze anderer Gattungen beinahe ausschließlich mittels fuPCR-Assay detektiert (schwarze Balkensegmente). In den Patientenproben betraf dies 29 von 35 nachgewiesene Nicht-*Candida*-Pilze, wie *Trichosporon* (n=13), *Aspergillus* (n=5), *Fusarium* (n=5), *Cryptococcus* (n=3), *Penicillium* (n=2) und *Cladosporium* (n=1). Diese fakultativ pathogenen Pilze wurden fast ausschließlich in

Patientenproben detektiert (23%; n = 35/152 versus 2,4%; n = 1/41 in der Kontrollgruppe).

Es konnte somit gezeigt werden, dass sich die Kultur gut für den Nachweis von *Candida* eignet, der fuPCR-Assay allerdings eine gute Ergänzung für den Nachweis anderer, hauptsächlich bei hämatologischen Patienten auftretender Pilzgattungen darstellt.

Um die Validität der fuPCR-Ergebnisse zu überprüfen, wurde anschließend mit der extrahierter DNA von 6 ausgewählten respiratorischen Proben eine zusätzliche Metagenom-Sequenzierung mittels Nanopore-Technologie durchgeführt. Da mit der Metagenom-Sequenzierung auch andere, nicht per fuPCR-Assay-detektierte Pilze in den Proben nachgewiesen werden konnten, wurden deshalb die Metagenom-Daten nur im Hinblick auf die im fuPCR-Assay nachgewiesenen Pilze analysiert. Der in der fuPCR erhaltene CT-Wert wurde mit der Readanzahl bzw. dem Readanteil des entsprechenden Pilzes, bezogen auf die Gesamtzahl an Reads, verglichen (Tab. 18). Weil mit der Nanopore-Sequenzierung das komplette Metagenom der Proben analysiert wurde (neben der Pilz-DNA auch die bakterielle und humane DNA), war der Anteil an Pilz-Reads zur Gesamtreadanzahl, wie zu erwarten, vergleichsweise gering (0-2%). Dennoch konnten die per fuPCR-Assay detektierten Pilze auch mit der Nanopore-Sequenzierung gefunden werden. Dabei zeigte sich, dass die Quantitäten der Nachweise bei beiden Methoden korrelierten. Deutlich wird das, wenn man die nachgewiesenen Pilze in der fuPCR semiquantitativ gewichtet und darüber in drei Gruppen einteilt (siehe Tab. 18): Detektion vor Zyklus 20 (+++), Detektion zwischen Zyklus 20 und 30 (++) , sowie Detektion nach Zyklus 30 (+). Ebenso wurden die aus der Nanopore-Sequenzierung erhaltenen Readzahlen für die detektierten Pilze semiquantifiziert: Mehr als 1000 Reads pro detektierten Pilz (+++), 10-1000 Reads (++) und weniger als 10 Reads (+).

Tab. 18: Nachgewiesene Pilze in fuPCR und Nanopore-Sequenzierung

Probe	Detektierter Pilz	fuPCR		Nanopore-Sequenzierung	
		CT Wert	Ergebnis semiquantitativ ¹	Anzahl Pilz-Reads n ¹	Ergebnis semiquantitativ ²
R7	<i>C. albicans</i>	17	+++	5.501	+++
	<i>Trichosporon</i> spp.	31	+	5	+
R25	<i>C. glabrata</i>	15	+++	1.159	+++
	<i>Fusarium</i> spp.	29	++	122	++
R47	<i>Penicillium</i> spp.	25	++	137	++
R57	<i>S. cerevisiae</i>	25	++	71	++
	<i>Fusarium</i> spp.	30	++	76	++
R97	<i>Candida</i> spp.	23	++	15	++
	<i>Trichosporon</i> spp.	33	+	2	+
R109	<i>C. albicans</i>	13	+++	2.703	+++
	<i>Trichosporon</i> spp.	32	+	2	+

¹CT < 20: +++; CT 20-30: ++; CT > 30: +

²Readzahl > 1000: +++; Readzahl 10-1000: ++; Readzahl < 10: +

Wie Tab. 18 (Zeilen 1, 3 und 10) zu entnehmen ist, zählen zu Gruppe +++ die Nachweise von *Candida albicans* und *Candida glabrata*. Pilze, die in der fuPCR zwischen Zyklus 20 und 30 detektiert wurden (Tab. 18 Zeile 4-8) hatten in der Nanopore-Sequenzierung 10-fach geringe Readzahlen (10-100). Es handelte sich hierbei um die Gattungen *Fusarium*, *Penicillium*, *Saccharomyces* und *Candida*. Pilze, die in der fuPCR nahe an der Detektionsgrenze (nach Zyklus 30) nachgewiesen wurden (*Trichosporon* spp.), erreichten in der Nanopore-Sequenzierung nur einstellige Readzahlen (2-5).

Insgesamt zeigten sich in diesen Proben die Pilz-Ergebnisse des fuPCR-Assays durch die Nanopore-Sequenzierung sowohl qualitativ als auch semi-quantitativ bestätigt.

3.2.2 Die Verwendung von Pilz-Antikörper-Assays ist für den Pilznachweis bei hämatologischen Patienten ungeeignet

Im Anschluss wurden die Blutproben per Kultivierung, Serologie und fuPCR-Assay auf das Vorkommen von Pilzen hin untersucht. Insgesamt wurden 39% (60/152) der Patienten- und 49% (20/41) der Probandenproben Pilz-positiv getestet. Es konnten 122 Pilze im Blut der Patienten und 30 Pilze im Blut der Kontrollprobanden detektiert werden, allerdings nur mittels Serologie und fuPCR-Assay und nicht per Kultur. Für die serologische Analyse wurden sowohl Antikörper- als auch Antigen-Assays genutzt. Die verwendeten Antikörper und Antigen-Assays waren in der Serologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als Routine-Screening auf Pilzpathogene etabliert. Diese kommerziellen Assays waren auf den Nachweis der Gattungen *Candida*, *Aspergillus* (Antikörper- und Antigen-Nachweise) und *Cryptococcus* (nur Antigen-Nachweise) beschränkt.

Die Nachweisrate mit dem Antikörper-Assay (Abb. 9; hellgrau gefüllter Kreis) war bei den Patientenproben mit 57% (n = 87/152) niedriger als bei den Kontrollprobanden (68% (n = 28/41)).

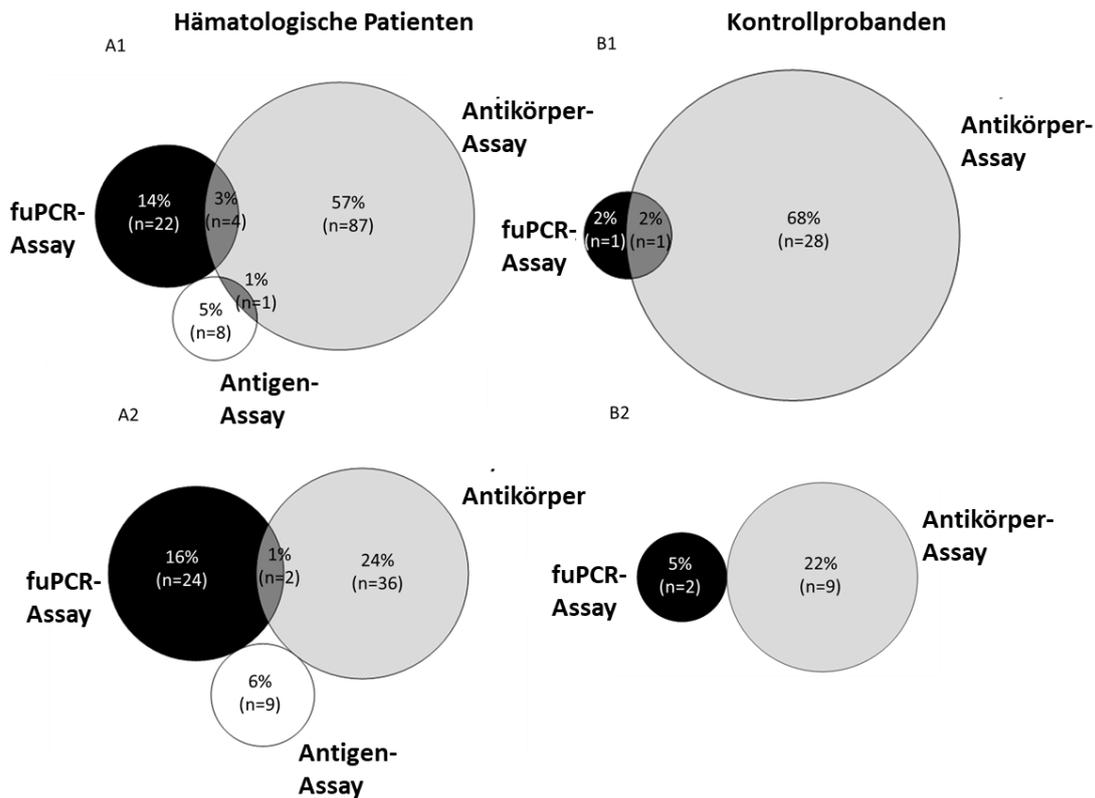


Abb. 9: VENN-Diagramm des prozentualen Anteils an Pilzen, die mittels fuPCR-Assay und Serologie im Blut nachgewiesen wurden

Proben von hämatologischen Patienten (n=152) (A1-2) und Kontrollen (n=41) (B1-2) wurden mittels fuPCR-Assay (schwarz), Antigen-Assay (weiß) und Antikörper-Assay (hellgrau) analysiert. Der Mehrfachnachweis durch zwei Methoden ist als Überlappung dargestellt (dunkelgrau). Für die Auswertung der Antikörper-Assays wurde ein Cut-off verwendet, bei dem entweder Antikörpertiter > 1:160 (A1, B1) oder > 1:320 (A2, B2) als positive Nachweise definiert wurden. Die Kreisgröße entspricht dem Prozentsatz der detektierten Pilze bezogen auf die Anzahl der Proben. Die Anzahl der nachgewiesenen Pilze ist in Klammern angegeben.

Auffällig war jedoch, dass die gemessenen Antikörper-Titer meist niedrig (< 1:320) waren (in 121 von 193 positiven Proben, sowohl von Kontrollprobanden als auch von Patienten). Die Nachweisraten sanken deutlich, wenn nur Proben mit höheren Antikörpertitern (\geq 1:320) betrachtet wurden (47/193 Proben). In diesem Fall war die Nachweisrate in der Patienten- und Kontrollgruppe gleich groß (24% (36/152) versus 22% (9/41)). Die erhöhte Zahl an Nachweisen mit niedrigem Titer bei den Gesunden wurde als ein pathophysiologisch irrelevantes Hintergrundrauschen interpretiert, welches aufgrund der neu erworbenen Hämatopoese und des immunsupprimierten Status bei den Patienten nicht vorkommen konnte.

Antigene von *Candida* und *Aspergillus* (Abb. 9; weiß gefüllter Kreis) wurden seltener als Antikörper und nur in Proben von Patienten (6%; 9/152 Proben) gefunden. *Cryptococcus*-Antigen wurde nicht nachgewiesen. Mittels fuPCR-Assay (Abb. 9, schwarz-gefüllter Kreis) waren Pilzspezies in Proben von hämatologischen Patienten nachweisbar (17%; 26/152), während die Nachweisraten in der Kontrollgruppe sehr gering waren (2/41). Der Vergleich der Methoden zeigte eine geringe Überlappung zwischen Antikörper- und fuPCR-Nachweis (4/152) und Antikörper- und Antigennachweis (1/152), während es zwischen Antigen- und fuPCR-Nachweis gar keine Überlappung gab.

Da ein Ziel der Studie war, das am besten geeignete Blutmaterial (Vollblut, Plasma oder Serum) für den Pilznachweis mittels fuPCR-Assay zu bestimmen, wurde im Anschluss untersucht, aus welchem Material die meisten Pilznachweise erfolgten und um welche Pilzgattungen es sich dabei handelte (siehe Abb. 10). 74% (20/27) der Pilznachweise in Proben von hämatologischen Patienten stammten aus Serum (n=11/27; schwarzes Balkensegment) und Blut (n=9/27; weißes Segment), während Pilz-DNA-Nachweise in Plasma (n=3/27; dunkelgraues Segment) nur 10% der gesamten Pilznachweise ausmachten. 15% (n=4/27) der Pilze im Patientenblut wurden sowohl im Plasma als auch im Vollblut (hellgraues Segment) gefunden. Die Analyse von Vollblut und Serum reichte demnach aus, um dreiviertel der detektierten Pilze abzudecken. Die Analyse von Plasma erbrachte bis auf 3 Detektionen von *Candida* keinen weiteren Mehrwert.

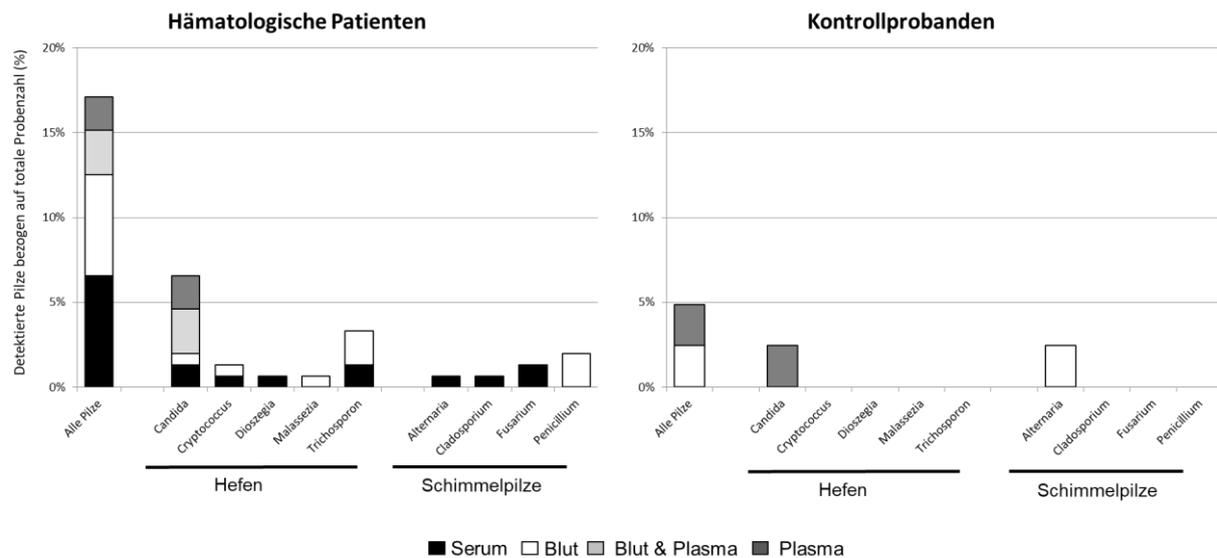


Abb. 10: Mittels fuPCR-Assay detektierte Pilzgattungen in Serum, Blut und Plasma

Der Prozentsatz der detektierten Pilze in Probensätzen von hämatologischen Patienten (n=152) (A) und gesunden Personen (n=41) (B) ist als Balkendiagramme dargestellt. Ein Probensatz enthält Serum (schwarz), Blut (weiß) und Plasma (dunkelgrau). Gleichzeitiger Nachweis in Blut und Plasma ist hellgrau dargestellt.

Nachgewiesen wurden insgesamt 27 Pilze, die 9 Gattungen zuzuordnen waren. Die meisten Nachweise erfolgten für *Candida* (10/27). Weniger häufig gefunden wurden: *Trichosporon* (5/27), *Penicillium* (3/27), *Cryptococcus* (2/27) und *Fusarium* (2/27). Nur je einmal wurden die Gattungen *Dioszegia*, *Malassezia*, *Alternaria* und *Cladosporium* detektiert. Während sich alle im Plasma nachgewiesenen Pilze (n=7/27) auf *Candida* beschränkten, wurden Vertreter der anderen Gattungen ausschließlich in Vollblut und Serum gefunden.

Wie schon die Analysen des respiratorischen Spülwassers gezeigt hatten, war der fuPCR-Assay eine gute Ergänzung zur Routinediagnostik (Serologie), da der Bereich der detektierbaren Pilze über *Candida*, *Aspergillus* und *Cryptococcus* hinaus erweitert wurde.

3.2.3 Der Verlust der Immunabwehr während der hämatologischen Behandlung führt zu einer erhöhten Pilzbelastung im Respirationstrakt

Da sich in Proben der Patienten häufiger Pilze nachweisen ließen als bei den Kontrollprobanden, wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem klinischen

Status der Patienten und einer erhöhten Pilznachweisrate bestand. Aufgrund der geringen Nachweisraten in den Blutpräparaten wurde nur das respiratorische Material betrachtet. Es wurde analysiert, ob eine Korrelation bestand zwischen der Häufigkeit der Pilznachweise und den unterschiedlichen Studienkohorten: Kontrollprobanden, Patienten vor Beginn der Konditionierung zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation, definiert als Gruppe 1 (siehe Kapitel 3.2) und Patienten nach der Konditionierung (Gruppe 2) (Tab. 19).

Tab. 19: Korrelationen der Häufigkeit der Pilznachweise mit der Studienkohorte

		Proben der Kontrollprobanden (n=41) n (%) ¹		Proben der hämatologischen Patienten (n=152) n (%) ¹		p ²
		-	+	-	+	
Respiratorisches Spülwasser	Konditioniert für Stammzelltransplantation	-	-	-	+	
	Probenanzahl	41	79	73		
	Proben positiv in Kultur und fuPCR	4 (10)	26 (33)	20 (27)	*	0.022
	Nur Kultur-positive Proben	8 (20)	26 (33)	20 (27)		0.298
	Nur fuPCR-positive Proben	5 (12)	17 (22)	27 (37)	**	0.008
	Proben positiv in Kultur und fuPCR	-	26 (33)	20 (27)		0.460
	Nur Kultur-positive Proben	-	26 (33)	20 (27)		0.460
	Nur fuPCR-positive Proben	-	17 (22)	27 (37)	*	0.036

¹Der relative Anteil in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der Proben ist in Klammern angegeben

²Signifikante Korrelationen zwischen Probensets sind mit * oder ** gekennzeichnet. P-Werte sind in Klammern angegeben

Mittels Chi Quadrat Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$) konnte festgestellt werden, dass der gleichzeitige Pilz-Nachweis durch fuPCR und Kultur in den Patientenproben statistisch signifikant häufiger war als in Proben von gesunden Probanden ($p = 0,022$) (Tab. 19). Wie in Tab. 19 Spalte 4 zu sehen ist zeigte die Anzahl der nur Kultur-positiven Proben keinen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollpersonen ($p = 0,298$), während die Anzahl der nur fuPCR-positiven Proben in der Patientengruppe statistisch signifikant erhöht war ($p = 0,008$). Das bedeutet, dass die Pilz-Nachweisrate bei den Patienten, im Vergleich zu den Gesunden, erhöht war durch Pilze, die sich nur per fuPCR detektieren ließen.

Im Vergleich von respiratorischen Patienten-Proben, die vor oder nach dem Beginn der Konditionierung zur Stammzelltransplantation entnommen wurden, zeigte sich eine statistisch signifikant höhere Anzahl fuPCR-positiver Proben nach Beginn der Konditionierung ($p = 0,036$) (Tab. 19). Daraus lässt sich schließen, dass die per fuPCR detektierte Pilze bei den Patienten vor allem im Status der starken Immunsuppression, also nach dem Beginn der Konditionierung zur Stammzelltransplantation, auftraten. So wurden beispielsweise *Trichosporon* und *Aspergillus* häufiger in Proben nach Beginn der Konditionierung gefunden. 10 von 14 *Trichosporon*- und 4 von 5 *Aspergillus*-Detektion erfolgten aus Proben nach der Konditionierung.

3.3 Verbesserung der Auswertbarkeit der fuPCR

3.3.1 Weiterentwicklung der fuPCR durch Einführung von TaqMan-Sonden

Die Ergebnisse der klinischen Studie hatten gezeigt, dass sich mit dem (in der Probenpräparation-verbesserten) fuPCR-Assay pathogene Pilze identifizieren lassen, die kulturell nicht nachweisbar waren. Zur Identifizierung der fuPCR-positiven Proben war jedoch ein komplexer Auswertalgorithmus erforderlich (siehe Kap. 3.2), um u.a. die SYBRGreen-markierten PCR-Produkte von Primerdimeren unterscheiden zu können. Um die fuPCR nun ebenfalls in ihrer Auswertbarkeit zu verbessern, sollten TaqMan-Sonden entwickelt werden, die an eine Sequenz innerhalb des Pilz-PCR Produktes binden und, mit einem Fluorophor markiert, nur bei Bindung an das Pilz-PCR-Produkt Fluoreszenz emittieren. So wären Primerdimere, die diese Sondenbindungsstelle nicht enthalten, nicht mehr detektierbar und das nun homogene PCR-Produkt quantifizierbar.

Im ersten Ansatz wurde versucht, eine Bindungsstelle für eine universelle, also für alle Reaktionen der fuPCR geeignete, Sonde zu designen und die Sonde anschließend auf ihre Eignung zu testen. Basierend auf der Sequenzdatenbank von Sebastian Rahn (77) wurde ein multiples Alignment von 21 zu detektierenden humanpathogenen Pilzspezies erstellt (Tab. 20).

Tab. 20: Pilzspezies für das multiple Alignment

Nr.	Pilzspezies	NCBI GenBank- Nummer
1	<i>Aspergillus versicolor</i>	EU497952.1
2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF138288.1
3	<i>Penicillium chrysogenum</i>	AJ004812.1
4	<i>Rhizopus microsporus</i>	JN561271.1
5	<i>Rhizomucor pusillus</i>	AB369914.1
6	<i>Mucor circinelloides</i>	DQ118990.1
7	<i>Cunninghamella elegans</i>	AF346409.1
8	<i>Absidia glauca</i>	AY944875.1
9	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	AB305110.1
10	<i>Fusarium oxysporum</i>	GQ376117.2
11	<i>Fusarium solani</i>	FJ478128.1
12	<i>Scedosporium apiospermum</i>	AB567756.1
13	<i>Cryptococcus neoformans</i>	AJ876598.1
14	<i>Cryptococcus gattii</i>	EU402436.1
15	<i>Trichosporon inkin</i>	FJ695475.1
16	<i>Trichosporon mucoides</i>	AB305104.1
17	<i>Candida albicans</i>	AB369915.1
18	<i>Candida glabrata</i>	FJ697172.1
19	<i>Candida dubliniensis</i>	AJ865081.1
20	<i>Candida krusei</i>	AB305095.1
21	<i>Candida tropicalis</i>	AY939810.1

Als Zielregion für das Alignment wurde der intergenische Bereich zwischen dem 5.8S und dem 28S rRNA-Gen gewählt (ITS2-Region), die Region, die die Zielsequenz der fuPCR darstellte (Abb. 11). Da der Primer 18SR in einer hochkonservierten Region bindet und in allen fuPCR-Reaktionen genutzt wird, wurde als erstes der flankierende Bereich (siehe orange markierter Bereich in Abb. 11) auf Konserviertheit untersucht.

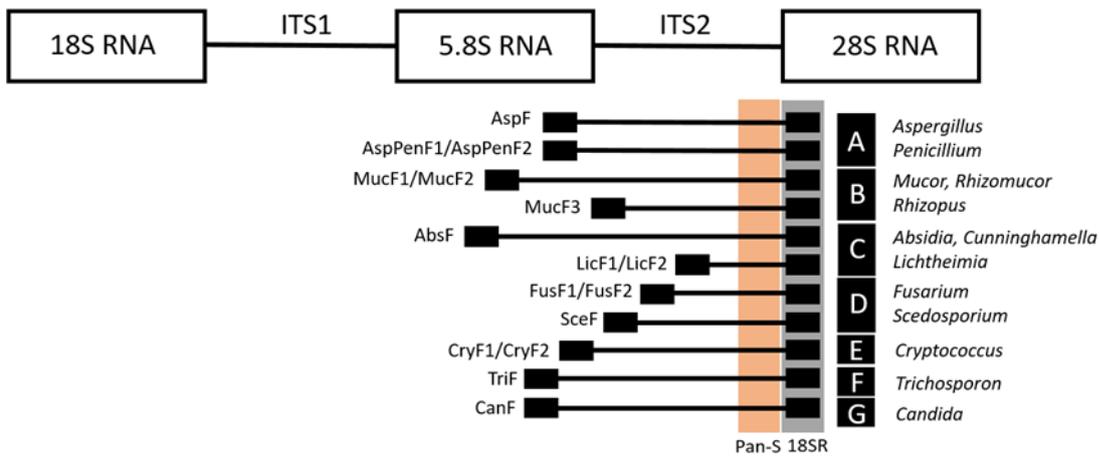


Abb. 11: Schematische Darstellung der Bindungsstelle der Sonde Pan-S

Für die Reaktionen A-G der fuPCR sind die Primer als schwarze Rechtecke eingezeichnet. Farblich markiert sind die hochkonservierten Bindungsregionen des Reverse-Primers 18SR (grau) und der Sonde Pan-S (orange).

Wie das multiple Sequenzalignment in Abb. 12 verdeutlicht, zeigte sich auf dem Gegenstrang 1 bp upstream der 18R-Bindungsstelle eine geeignete Bindungsregion für eine universale Sonde (Pan-S).

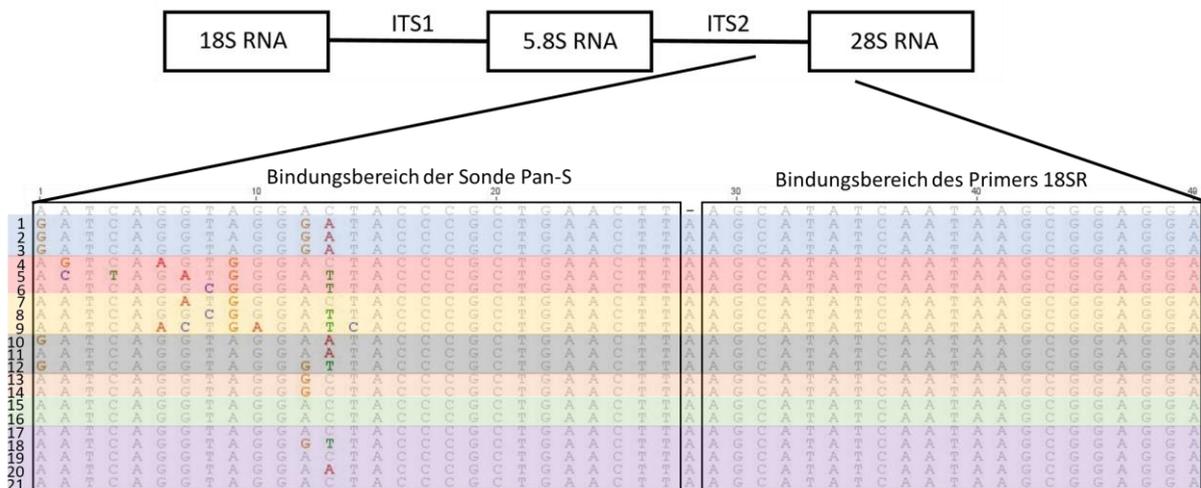


Abb. 12: Multiples Alignment der Bindungsstellen der Sonde Pan-S und des Primers 18SR

Das Alignment wurde mit repräsentativen Sequenzen von 21 verschiedenen Pilzspezies, die sich entweder mit fuPCR A (blaue Markierung), B (rot), C (gelb), D (grau), E (orange), F (grün) oder G (violett) detektieren lassen, sowie mit der Sequenz der Sonde Pan-S und des Primers 18SR (beide weiß) erstellt. Die Bezeichnung der verwendeten Pilzspezies ist Tab. 20 zu entnehmen. Die Bindungsbereiche der Sonde und des Primers sind mit einem schwarzen Rahmen markiert.

Bei der genaueren Analyse dieser Region fiel auf, dass abhängig von Pilzgattung die Bindungssequenz im Vergleich zur Sonden-Sequenz variierte. Besonders viele Punktmutationen (bis zu 6 Nukleotide) wurden bei den Pilzgattungen *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Absidia*, *Lichtheimia* und *Cunninghamella* festgestellt, die mit den fuPCR Reaktionen B und C detektiert werden sollten, sodass bei diesen Reaktionen mit einer beeinträchtigten Bindung der Sonde zu rechnen war. Da allerdings die Region am 3'-Ende der Sonde bei allen Spezies im Alignment hochkonserviert war, wurde von einer ausreichenden Bindung der Sonde ausgegangen und die 6-FAM-markierte Pan-S Sonde mit den fuPCR-Primern als Taqman-PCR im Vergleich zu der ursprünglichen SYBRGreen-markierten fuPCR in allen Reaktionen der fuPCR (A-G) getestet. Als Template (Amplifikationsmatrize) kamen die anfänglich Plasmid-klonierten fuPCR Produkte in serieller Verdünnung ($2,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^0$ Kopien/PCR) zum Einsatz (siehe Kapitel 2.1 Tab. 7), um die minimale Zahl an DNA-Kopien zu ermitteln, die für eine Detektion in beiden fuPCRs notwendig war. Als Detektionslimit wurde definiert, wenn noch beide Reaktionen einer Doppelbestimmung eine Amplifikationskurve zeigten. Abb. 13 zeigt die Amplifikationskurven dieser Austestung. Bei SYBRGreen-PCRs wurde zusätzlich der Schmelzpunkt des PCR-Produktes betrachtet. Lag dieser unter 80 °C, ließ das auf Primer-Dimere schließen. Diese Amplifikationskurven wurden in der Abbildung hellblau eingefärbt und nicht als positiv bewertet.

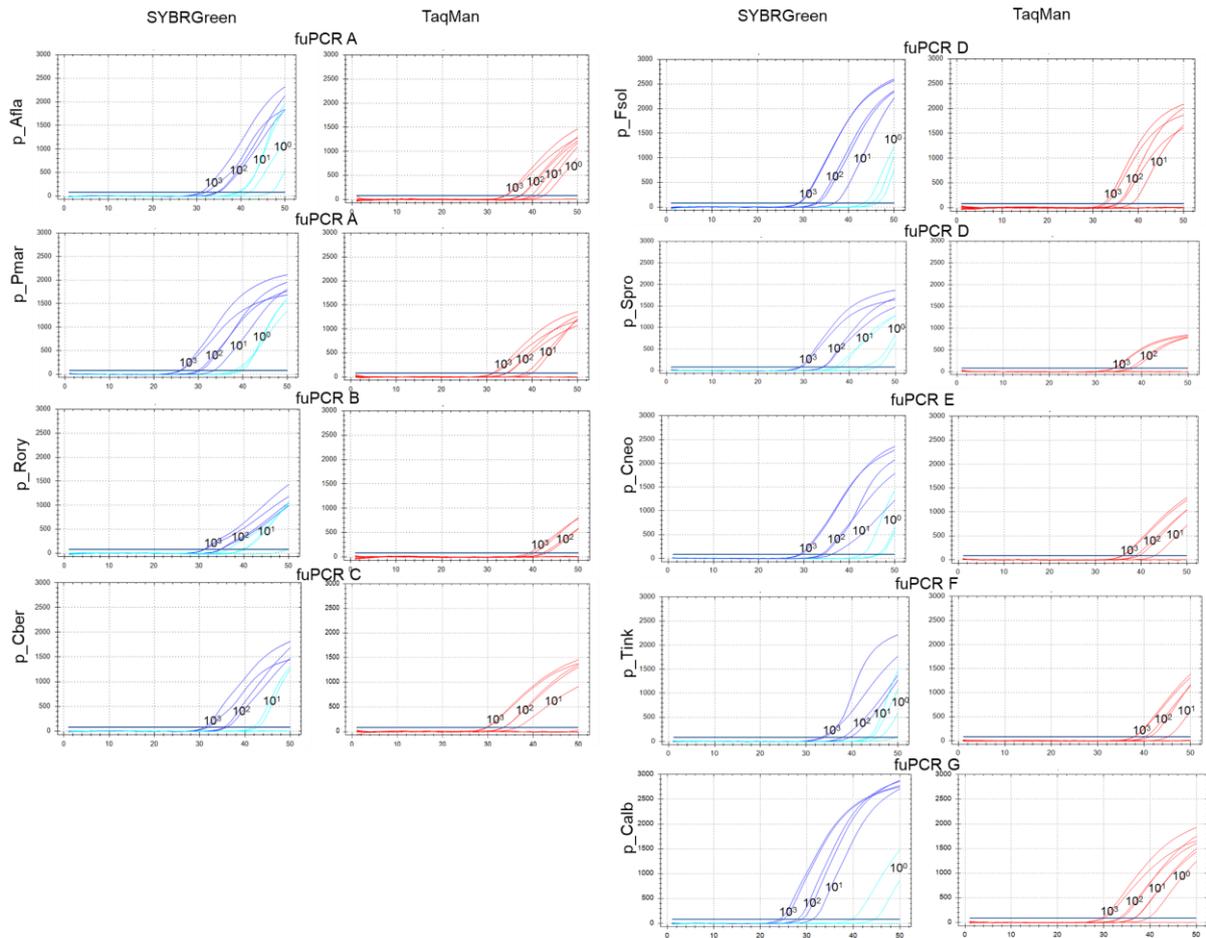


Abb. 13: Vergleich der Detektionsgrenzen der fuPCR-Reaktionen im SYBRGreen- und TaqMan-Ansatz

In Doppelbestimmung wurden Plasmid-klonierte fuPCR Produkte in serieller Verdünnung ($2,5 \times 10^3$ – $2,5 \times 10^0$ Kopien/PCR) mit einem SYBRGreen- (blau) und TaqMan (rot) -Ansatz amplifiziert. Amplifikationskurven, die nur zu Primer-Dimeren im SYBRGreen-Ansatz führten sind hellbau markiert. Die Plasmid-Bezeichnungen sind in Tab. 7 (Kapitel 2.1) erläutert. Die eingesetzte Verdünnungsstufe der Plasmide ist an den Amplifikationskurven vermerkt.

Es fiel auf, dass bei gleicher Menge eingesetzten Plasmids die TaqMan-PCRs 5 Zyklen später positiv wurden als die SYBRGreen-PCRs. Dieser Verlust an Sensitivität, der in der Regel durch den Sonden-basierten Spezifitätsgewinn zu erklären ist, hatte allerdings keinen Einfluss auf das Detektionslimit der Reaktionen. Dies lag vor allem an der verbesserten Auswertbarkeit der TaqMan PCR. Während bei den SYBRGreen-PCRs bei gering konzentrierter Template-DNA ($2,5 \times 10^0$ - $2,5 \times 10^1$ Kopien/PCR) in höheren Zyklenzahlen Primerdimere auftraten und diese nicht vom PCR-Produkt unterschieden werden konnte, trat dieses Problem bei den TaqMan-PCRs nicht auf, da die Primer-Dimere nicht detektiert wurden. Deshalb konnten die TaqMan-PCRs auch mit mehr Zyklen (45 statt 40) durchgeführt werden, ohne dass sie falschpositiv

wurden. Somit wies die TaqMan-PCR in den Reaktionen zur Detektion von *Rhizopus* (p_Rory), *Cunninghamella* (p_Cber), *Fusarium* (p_Fsol), *Scedosporium* (p_Spro), *Cryptococcus* (p_Cneo) und *Trichosporon* (p_Tink) (fuPCR B, C, D, E und F) die gleiche Detektionsgrenze auf wie die SYBRGreen-basierte PCR (Abb. 14). Diese lag bei $2,5 \times 10^2$ DNA-Kopien. In den TaqMan-PCRs zur Detektion von *Aspergillus* (p_Afla) und *Penicillium* (p_Pmar) (fuPCR A) und *Candida* (p_Calb) (fuPCR G) wurden sogar noch $2,5 \times 10^1$ DNA-Kopien/PCR detektiert, also 1/10 der Menge, die für eine Amplifikation im SYBRGreen-Ansatz notwendig waren (Abb. 13).

Im Anschluss an die Bestimmung der Detektionsgrenze folgte die Analyse der Amplifikationsgüte der TaqMan-PCR. Dafür wurde genomische Pilz-DNA in 10er-Verdünnungsreihen von 12,5 ng bis 0,125 pg pro PCR eingesetzt und amplifiziert. Exemplarisch sind in Abb. 14 die Amplifikationskurven für *Penicillium chrysogenum* und *Scedosporium apiospermum* abgebildet.

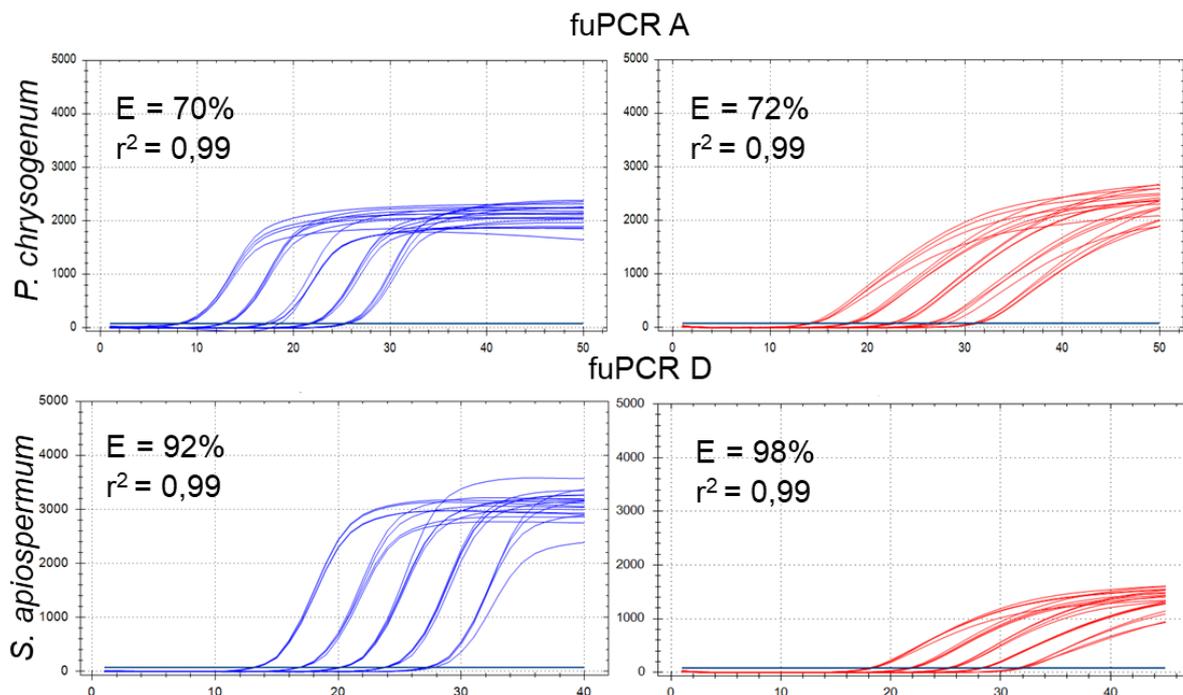


Abb. 14: Amplifikationskurven von *P. chrysogenum* und *S. apiospermum* mit SYBRGreen- und TaqMan-Ansatz

In Vierfachbestimmung wurde genomische DNA in serieller Verdünnung (12,5ng bis 0,125pg/PCR) mit einem SYBRGreen- (blau) und TaqMan (rot) -Ansatz amplifiziert. Die Stamm-Bezeichnungen der genomischen DNA sind Tab. 6 (Kapitel 2.1) zu entnehmen. Die errechnete Effizienz (E) und Linearität (r^2) ist für jede Reaktion angegeben.

Nach Durchführung der PCR wurden Linearität (r^2) und Effizienz (E) der Amplifikation berechnet (Tab. 21). In dem Bereich, in dem der r^2 -Wert $> 0,99$ beträgt, verläuft die Amplifikation der unterschiedlichen DNA-Mengen so linear, dass sich CT-Wert und eingesetzte DNA-Menge korrelieren lassen. E wiederum beschreibt, wie effizient die Amplifikate pro PCR-Zyklus vervielfältigt werden. Eine PCR-Effizienz von 100% bedeutet demnach eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus. Für diagnostisch genutzte PCR-Ansätze sollte r^2 bei $\geq 0,99$ und E bei 90-110% liegen (82).

Tab. 21: Vergleich von Linearität und Effizienz der Amplifikation der fuPCR-Reaktionen mit SYBRGreen- und TaqMan-Ansatz

PCR	Pilzspezies ¹	Linearität / r^2		Effizienz (%)	
		SYBRGreen	TaqMan	SYBRGreen	TaqMan
fuPCR A	<i>A. versicolor</i>	0,99	0,99	87	83
	<i>A. fumigatus</i>	0,99	0,99	88	88
	<i>P. chrysogenum</i>	0,99	0,99	70	72
fuPCR B	<i>R. microsporus</i>	0,99	0,99	92	83
	<i>R. pusillus</i>	0,98	NA	94	NA
	<i>M. circinelloides</i>	0,98	NA	85	NA
fuPCR C	<i>C. elegans</i>	0,99	0,99	78	84
	<i>A. glauca</i>	0,99	NA	53	NA
	<i>L. corymbifera</i>	0,95	NA	133	NA
fuPCR D	<i>F. oxysporum</i>	0,99	0,99	87	89
	<i>F. solani</i>	0,99	0,99	83	84
	<i>S. apiospermum</i>	0,99	0,99	92	98
fuPCR E	<i>C. neoformans</i>	0,99	0,99	88	81
	<i>C. gattii</i>	0,99	0,99	80	84
fuPCR F	<i>T. inkin</i>	0,99	0,99	75	83
	<i>T. mucoides</i>	0,99	0,99	82	84
fuPCR G	<i>C. albicans</i>	0,99	0,99	80	90
	<i>C. glabrata</i>	0,99	0,99	81	84
	<i>C. dubliniensis</i>	0,99	0,99	82	90
	<i>C. krusei</i>	0,99	0,99	81	81
	<i>C. tropicalis</i>	0,90	0,99	90	99

¹Die Stammbezeichnungen der Pilzspezies sind Tab. 6 (Kapitel 2.1) zu entnehmen

Die Linearität der SYBRGreen-PCRs lag für 17 der 21 getesteten Pilze bei dem geforderten Wert von 0,99. Schlechtere Werte erreichte die Amplifikation von *R. pusillus* (0,98), *M. circinelloides* (0,98), *L. corymbifera* (0,95) und *C. tropicalis* (0,90). Die TaqMan-PCRs erreichten alle Linearitätswerte von 0,99.

Die Amplifikations-Effizienz lag in vier der SYBR-Green-PCRs im geforderten Bereich von 90-110%. Das traf für die Amplifikation von *Rhizopus microsporus* und *Rhizomucor pusillus* (92 und 94%; beide fuPCR B), sowie für *Scedosporium apiospermum* (92%; fuPCR D) und *Candida tropicalis* (90%; fuPCR G) zu (siehe Tab. 21). Weitere getestete Pilze ließen sich nur mit 80-88% Effizienz amplifizieren. Darunter waren *Aspergillus versicolor* und *fumigatus* (87 und 88%; beide fuPCR A), *Mucor circinelloides* (85%; fuPCR B), *Fusarium oxysporum* und *solani* (87 und 83%, beide fuPCR D), *Cryptococcus neoformans* und *gattii* (88 und 80%; beide fuPCR E), *Trichosporon mucoides* (82%, fuPCR F) sowie *Candida albicans*, *glabrata*, *dublinsiensis* und *krusei* (80, 81, 82 und 81%; alle fuPCR G). Eine besonders schlechte Amplifikationseffizienz wiesen die Pilze *Penicillium chrysogenum* (70%; fuPCR A), *Cunninghamella elegans* und *Absidia glauca* (78 und 53%; beide fuPCR C), sowie *Trichosporon inkin* (75%; fuPCR F) auf. Die Amplifikationseffizienz von *Lichtheimia corymbifera* lag ebenfalls außerhalb der Norm bei 133% (fuPCR C).

Mit dem TaqMan-Ansatz ließen sich 12 der 21 getesteten Pilze mit einer höheren Effizienz als im SYBRGreen-Ansatz amplifizieren. Darunter befanden sich *C. tropicalis* (99%), *S. apiospermum* (98%), *C. albicans* (90%), *C. dubliniensis* (90%), *F. oxysporum* (89%), *C. elegans* (84%), *F. solani* (84%), *C. gattii* (84%), *T. mucoides* (84%), *C. glabrata* (84%), *T. inkin* (83%), sowie *P. chrysogenum* (72%). Weitere 2 Pilze wiesen die gleiche Amplifikationseffizienz wie im SYBRGreen-Ansatz auf: *A. fumigatus* (88%) und *C. krusei* (81%). Eine schlechtere Amplifikationseffizienz im Ansatz mit der TaqMan-Sonde als mit SYBRGreen zeigten nur 3 Pilze: *A. versicolor* (83%), *R. microsporus* (83%) und *C. neoformans* (81%). Als problematisch stellten sich die Spezies *M. circinelloides*, *R. pusillus* (fuPCR B) sowie *A. glauca* und *L. corymbifera* (fuPCR C) heraus, da sie sich nur im SYBRGreen-Ansatz amplifizieren ließen; es erfolgte keine Detektion in den entsprechenden Taqman-PCRs. Für diese Spezies war, wie bereits vorher erwähnt, bei der Betrachtung der Sonden-Bindungsregion im multiplen Alignment aufgefallen, dass die Sequenz im Vergleich zur Sonde Punktmutationen enthielt (siehe Abb. 12). Die Annahme, dass diese Variationen nicht

den kompletten Ausfall der Speziesdetektion nach sich ziehen würde, hatte sich hier leider nicht bestätigt. So wurden im folgenden weitere Sonden als Varianten der Pan-S Sonde entwickelt, um auch diese Gattungen detektieren zu können (Abb. 15). Insgesamt wurden drei neue Sonden entworfen, Rhizo-S (Detektion von *Rhizomucor*), Absgla-S (Detektion von *Mucor* und *Absidia*) sowie Lichchor-S (Detektion von *Lichtheimia*).

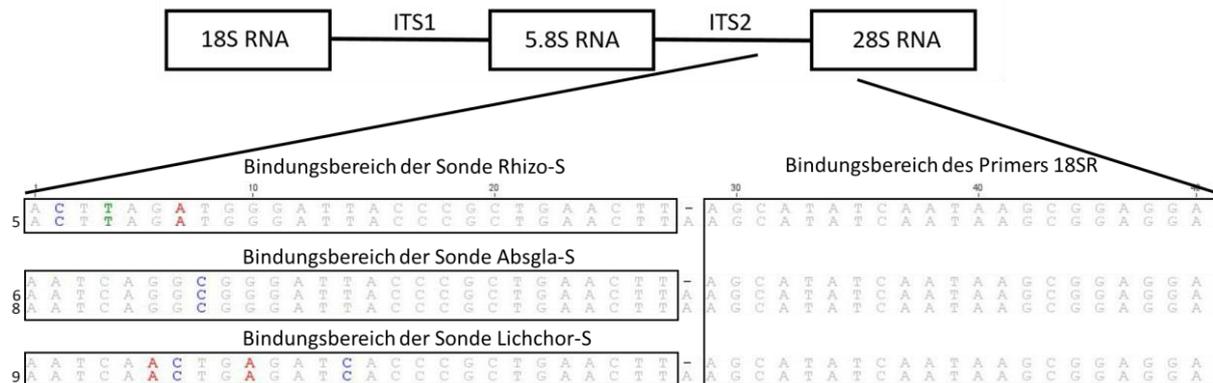


Abb. 15: Multiples Alignment der Bindungsstelle der neuen Sonden Rhizo-S, Absgla-S und Lichcor-S

Das Alignment wurde mit repräsentativen Sequenzen von vier verschiedenen Pilzspezies sowie der Sequenzen der Sonden Rhizo-S, Absgla-S und Lichcor-S und des Primers 18sR erstellt. Die Bezeichnung der verwendeten Pilzspezies ist Tab. 20 zu entnehmen. Die Bindungsbereiche der Sonden und des Primers sind mit einem schwarzen Rahmen markiert.

Die Güte der Amplifikation wurde im Anschluss wie zuvor beschrieben mit genomischer DNA von *Rhizomucor pusillus*, *Mucor circinelloides*, *Absidia glauca* und *Lichtheimia corymbifera* getestet (12,5 ng bis 0,125 pg pro PCR). Dafür wurden die genomischen DNAs jeweils in der SYBRGreen-fuPCR und den zwei TaqMan-Ansätzen mit der ursprünglichen Sonde Pan-S und der neuen Sonde amplifiziert und die Linearität sowie die Effizienz der Amplifikation berechnet (Abb. 16).

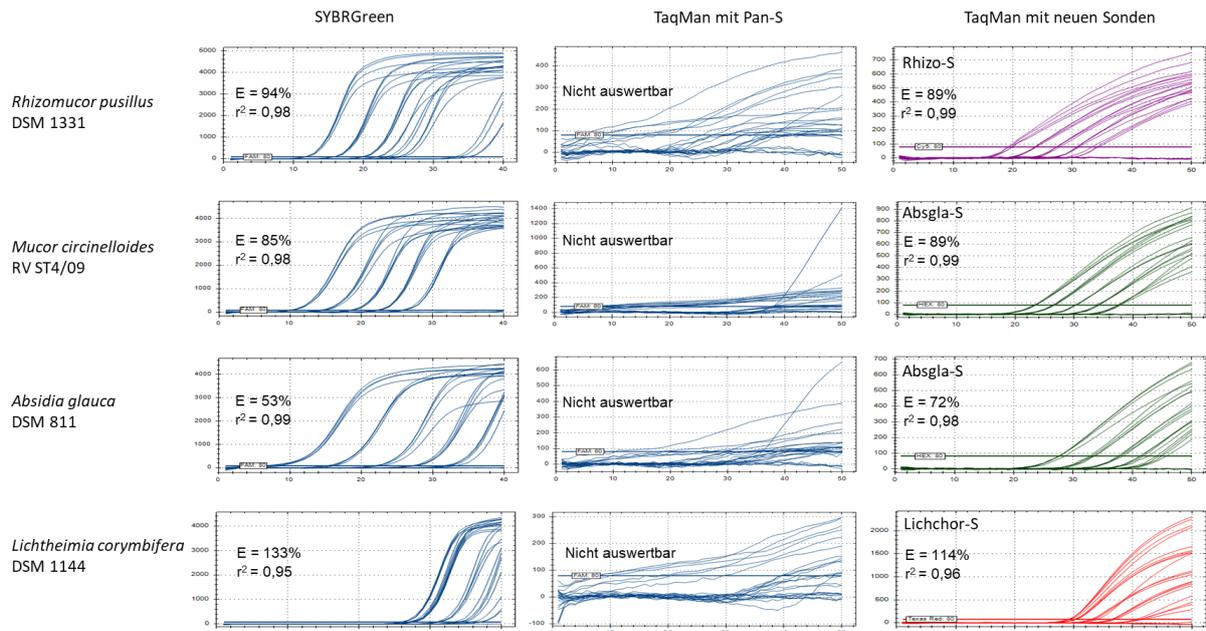


Abb. 16: Amplifikation genomischer DNA in fuPCR Reaktionen B und C in SYBRGreen- und TaqMan-Ansätze

In serieller Verdünnung (12,5ng bis 0,125pg/PCR) wurde genomische DNA von *R. pusillus* und *M. circinelloides* (beide fuPCR B) und *A. glauca* und *L. corymbifera* (beide fuPCR C) in einem SYBRGreen-Ansatz ohne Sonde, einem TaqMan-Ansatz mit der Sonde Pan-S und einem TaqMan-Ansatz mit den Sonden Rhizo-S, Absgla-S oder Lichcor-S amplifiziert. Die errechnete Effizienz (E) und Linearität (r^2) ist angegeben.

Durch die neu entwickelten Sonden ließen nun auch im Gegensatz zu vorher eine Amplifikation der DNAs mit dem TaqMan-Ansatz detektieren. Die Linearität lag für alle getesteten DNAs bei $r^2 \geq 0,95$, sowohl für den SYBRGreen- als auch für den TaqMan-Ansatz. In der fuPCR B erreichte die Amplifikationseffizienz für *R. pusillus* für den SYBRGreen-Ansatz einen Wert von 94% und für den TaqMan-Ansatz 89%. Für *M. circinelloides* lagen die Werte bei 85% (SYBRGreen) und 89% (TaqMan). Für den TaqMan-Ansatz lagen somit beide nur knapp unter der geforderten Norm von 90-110%. Bei fuPCR C zeigte sich allerdings, wie vorher bereits beobachtet eine schlechte Amplifikationseffizienz. Obwohl sie in beiden Fällen für den TaqMan-Ansatz besser war (*A. glauca*: 72% im TaqMan-Ansatz vs. 53% im SYBRGreen-Ansatz; *L. corymbifera*: 114% vs. 133%).

Da vor allem die die Amplifikation von *Lichtheimia corymbifera* sowohl mit als auch ohne Sonde stark inhibiert war, obwohl in der Sequenz aus der Datenbank keine Passungenaugigkeit der Primer (LicF1 und 18SR) und Sonde (Lichchor-S) zu erkennen war, wurde die DNA-Sequenz dieser Spezies nochmal näher analysiert.

Um auszuschließen, dass die verwendete genomische DNA von *Lichtheimia corymbifera* (DSM 1144) im amplifizierten Bereich Punktmutationen zu der Sequenz in der Datenbank aufwies, wurde sie in einer den ITS1-ITS2 Bereich umspannenden Pan-PCR mit den Pan-Primern 18SF und 18SR amplifiziert (siehe Abb. 17), und das PCR-Produkt Sanger-sequenziert. Die Sanger-Sequenz des DSM1144-Stamms war mit der in der Datenbank gespeicherten Sequenz identisch (Abb. 17).

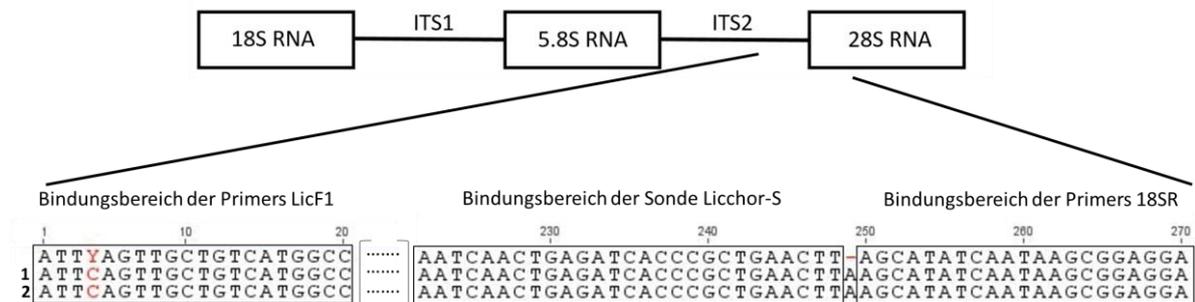


Abb. 17: Alignment der Sequenzen von *Lichtheimia corymbifera* (DSM 1144) mit Primern (LicF1 und 18SR) und Sonde (Licchor-S)

Die Sequenzen von *L. corymbifera* entsprechen einer Sanger-Sequenzierung der genomischen DNA des Stammes DSM 1144 (1) und der Sequenz dieses Stammes in der NCBI-Datenbank (AB305110.1 (2)).

Eine Passungenauigkeit von Forward-Primer und Sonde konnte somit ausgeschlossen werden. Es blieb zu vermuten, dass Sekundärstrukturen der DNA oder andere Parameter der PCR für die schlechte Amplifizierbarkeit von *L. corymbifera* verantwortlich sind. So könnten in zukünftigen Austestungen die Konzentrationen von Primer und Sonde im PCR-Ansatz variiert, sowie unterschiedliche Puffer-Systeme für den Master-Mix getestet werden, bevor man eine andere Zielregion austestet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Spezifität der fuPCR-Reaktionen durch die Einführung der neuen Sonden erhöht wurde, da zusätzlich zu den Primern auch die Sonde an die DNA binden musste, um das PCR-Produkt detektieren zu können. Wie zu erwarten war, ging die erhöhte Spezifität mit einem Verlust an Sensitivität einher. Der Verlust an Sensitivität hatte allerdings, aufgrund der verbesserten Auswertbarkeit, keinen Einfluss auf das Detektionslimit der Reaktionen. Da ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die TaqMan-Ansätze eine gleichwertige bis höhere Linearität und Effizienz der Amplifikation aufwiesen als SYBRGreen, sollte für eine

spätere diagnostische Nutzung die fuPCR von einem SYBRGreen-basierten auf einen TaqMan-basierten Ansatz umgestellt werden.

3.3.2 Erfolgreicher Einsatz der Sonden basierten PCR-Ansätze bei klinischen Proben

Um zu prüfen, ob sich die entwickelte TaqMan-PCR auch für den Pilznachweis in klinischem Probenmaterialien eignet, wurden vier *Candida*- und vier *Aspergillus*-Proben aus den Blut-Spike-in Experimenten, sowie 10 Proben aus der klinischen Studie per SYBRGreen- und TaqMan-PCR (mit Sonde Pan-S) retrospektiv analysiert. Die CT-Werte sind in der nachfolgenden Tab. 22 aufgeführt.

Tab. 22: Vergleich der CT-Werte von SYBRGreen- und TaqMan-PCR-Ansatz

		Nachgewiesener Pilz ¹	SYBRGreen-PCR	TaqMan-PCR	
fuPCR	Probe		CT	CT	
A	C4-1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	16	Proben aus Spike-in-Experimenten
	C10-1		15	20	
	C4-2		18	21	
	C10-2		21	24	
G	C4-3	<i>Candida glabrata</i>	8	14	
	C10-3		14	19	
	C4-4		22	25	
	C10-4		25	31	
A	R176-1	<i>Aspergillus spp.</i>	25	31	Proben aus klinischer Studie
	R167-1	<i>Penicillium spp.</i>	27	38	
D	R100-1	<i>Fusarium spp.</i>	27	32	
E	R124-1	<i>Cryptococcus spp.</i>	33	38	
F	R100-2	<i>Trichosporon spp.</i>	31	36	
G	R176-2	<i>Candida sake</i>	27	32	
	R40-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20	26	
	R42-1	<i>Candida dubliniensis</i>	26	32	
	R53-1	<i>Cladosporium spp.</i>	24	30	
	S162-1	<i>Alternaria spp.</i>	Negativ	40	

¹Die Identifizierung der Pilze erfolgte durch Sanger-Sequenzierung nach positiver fuPCR-Reaktion im Zuge der Spike-in-Experimente und der klinischen Studie und wurde durch Sanger-Sequenzierung aus den TaqMan-Ansätzen bestätigt

Mit Ausnahme von Probe S162-1 ließen sich alle anderen sowohl per SYBRGreen- als auch per TaqMan-PCR in der jeweiligen fuPCR-Reaktion amplifizieren. Wie bereits bei den Sonden-Austestungen zuvor beobachtet, wurden 16 der 18 Proben mit der TaqMan-PCR 3-6 Zyklen später positiv als mit der SYBRGreen-PCR. Eine Ausnahme bildete die Probe R167-1 (Tab. 22). Hier erfolgte der Nachweis von *Penicillium* mit dem TaqMan-Ansatz 11 Zyklen später als mit dem SYBRGreen-Ansatz, was ein Hinweis auf eine nicht optimale Bindung der Sonde Pan-S an die Sequenz von *Penicillium* hindeuten könnte. Trotzdem ließen sich mittels Sanger-Sequenzierung und BLAST-

Analyse der PCR-Produkte aus den TaqMan-PCRs alle mit der SYBRGreen-PCR nachgewiesenen Pilze bestätigen, sodass die spätere Detektion keinen negativen Einfluss auf die generelle Nachweisbarkeit des Pilzes hatte. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch Probe S162-1 (Tab. 22). Diese Probe war bereits in der klinischen Studie für *Alternaria* nur schwach positiv gewesen (CT-Wert: 34). Nach der dreijährigen Lagerung bei -80 °C wurde sie im SYBRGreen-Ansatz nicht mehr positiv, konnte allerdings schwach positiv mittels des TaqMan-Ansatzes detektiert (CT-Wert: 40) und die Identität des Pilzes per Sanger-Sequenzierung und BLAST-Analyse bestätigt werden. Somit konnte deutlich gezeigt werden, dass sich der Sonden-basierte Ansatz der fuPCR auch für die Detektion von Pilzen aus klinischem Probenmaterialien eignete.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die fuPCR zu verbessern und in einer klinischen Studie deren Nutzen für die Pilzdiagnostik bei hämatologischen Patienten zu prüfen. Die Verbesserung der fuPCR erreichten wir durch zwei Modifikationen. Zum einen steigerten wir die Menge an extrahierten Pilze-DNA durch Implementierung eines „Bead beating“ Schritts und zum anderen erreichten wir eine höhere fuPCR-Spezifität durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Sonden, die darüber hinaus auch die Auswertbarkeit der PCR-Ergebnisse erleichterten.

Um ein optimales Protokoll für den Aufschluss von Hefen als Vertreter *Candida* und Schimmelpilzen als Vertreter *Aspergillus* zu finden, wurden in dieser Arbeit Vertreter dieser beiden, nach dem DHS-System definierten Gruppen getestet. In der Literatur finden sich häufig Testsysteme, in denen Pilzreferenzstämme PBS-Pufferlösungen zugesetzt und analysiert wurden. Dies bietet zwar den Vorteil, die Versuchsbedingungen sehr gut kontrollieren zu können und eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen, allerdings spiegeln diese artifiziellen Puffer-Suspensionen keine realistische Situation für den Pilz-Aufschluss in Patientenmaterial wider. Deshalb wurde für die vorliegende Arbeit die Entscheidung getroffen, sowohl in artifiziellem Puffer als auch in klinischem Probenmaterial zu arbeiten. Des Weiteren wurde mit klinischen Pilzisolaten und nicht mit Referenzstämmen gearbeitet, da in der Vergangenheit bereits festgestellt wurde, dass Referenzstämme während der Langzeitkultivierung pathophysiologische Eigenschaften verlieren können, was durchaus auch einen Einfluss auf die Effizienz der DNA-Extraktion haben kann (83).

In der Literatur werden zum mechanischen Aufbrechen von Pilzzellwänden zumeist das „Bead beating“ und die Ultraschallbehandlung angeführt. Letztere zeigte sich besonders für die Freisetzung bakterieller DNA geeignet, wies allerdings keine gute Effizienz bei der Extraktion von Pilz-DNA auf (84, 85). Hierfür wird die deutlich komplexere und somit widerstandsfähigere Zellwandstruktur der Pilze im Vergleich zu Bakterien verantwortlich gemacht (86, 87). Aufgrund des schlechteren Aufschlusses hatte die Ultraschallbehandlung seinerzeit auch keine Anwendung für die Routine-DNA-Extraktion zum molekulargenetischen Nachweis von Pilzen am hiesigen Institut gefunden. Diese bestand aus einer Behandlung mit flüssigem Stickstoff, Proteinase K Lyse sowie chemischer Lyse mit dem EZ1-BioRobot. In der vorliegenden Arbeit konnte

gezeigt werden, dass der „Bead beating“ Schritt, im Gegensatz zum Stickstoff-Schritt, zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Ausbeute bei Aufschluss von Hefe (*Candida*) und Schimmelpilzen (*Aspergillus*) führte. Dies deckt sich nicht mit den Befunden anderer Studien, die die Behandlung mit flüssigem Stickstoff für die Extraktion von Pilz-DNA mit „Bead beating“ verglichen, und eine signifikant höhere Ausbeute an genomischer DNA für Proben beobachteten, die mit Stickstoff behandelt worden waren (65, 88). Unsere Befunde entsprechen denen aus Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass alternierendes Einfrieren und Auftauen von *Aspergillus* und *Fusarium* aus Bodenproben zu einer geringeren DNA-Freisetzung führte im Vergleich mit mechanischen Extraktionsmethoden (89-92). Die auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinenden Befunde könnten auf die unterschiedlichen Probenarten zurückzuführen sein. Während nämlich die Befürworter des Stickstoff-Schrittes mit lyophilisierten Myzelien arbeiteten, deren Lyseeigenschaften nicht der Gegenstand unserer Untersuchungen waren, kamen in unserer Studie wie auch bei den Befürwortern des mechanischen Zellaufschlusses Suspensionen aus frisch gewachsenen Pilzzellen zum Einsatz. Limitierend für den Aufschluss mittels „Bead beating“ ist die starke mechanische Beanspruchung der DNA und als deren mögliche Folge eine Fragmentierung der Nukleinsäuren. Andere Arbeitsgruppen hatten diese Längenabnahme der DNA-Fragmente bereits für Proben, die mit „Bead beating“ behandelt wurden, beobachtet. (93, 94). Diese Befunde decken sich nur zum Teil mit den Ergebnissen dieser Studie, in der die Häufigkeit des „Bead beatings“ zwar einen negativen Effekt auf die DNA-Fragmentlängen von *Candida* und *Aspergillus* in PBS-Suspensionen hatte, doch die erhöhte DNA-Freisetzung durch dreifaches „Bead beating“ die DNA-Fragmentierung insofern kompensieren konnte, dass sich die Menge der fuPCR-Zielsequenzen (< 300 bp) nicht veränderte. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte Fragmentierung der fungalen DNA aus klinischem Probenmaterial (Blut oder respiratorisches Spülwasser) nicht beobachtet. Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Matrices der Patientenmaterialien im Vergleich zu Puffer-Lösung erklären. So erfordert der hohe Anteil an menschlichen und mikrobiellen Zellen in den Proben vermutlich eine höhere Anzahl von „Bead beating“ Schritten, um die Pilzzellen zu zerstören. Dadurch ist die freigesetzte Pilz-DNA dem „Bead beating“ kürzer ausgesetzt ist und weniger fragmentiert.

Obwohl „Bead beating“ für beide getesteten DHS-Gruppen die DNA-Ausbeute erhöhte, war die Steigerung bei *Candida* höher, da Schimmelpilze wie *Aspergillus* durch ihre widerstandsfähige Zellwand geschützt sind (95). Dies gilt im Besonderen für *Aspergillus*-Konidien, die robuste thalliche Form der Pilzzellen. Die äußere Zellwand der Konidien besteht aus zwei Schichten Hydrophobin und Melanin, die für ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber physikalischen Angriffen verantwortlich sind (63, 96). Daher wird vor allem vor allem die Extraktion von *Aspergillus*-DNA aus Konidien problematisch angesehen (73, 97-100). Dieser deutlich erschwerte Aufschluss von Schimmelpilzen führte dazu, dass die European *Aspergillus* PCR Initiative (EAPCRI) bereits im Jahre 2010 ein standardisiertes Protokoll für die Extraktion von *Aspergillus*-DNA aus Vollblut entwickelte, in dem sie „Bead beating“ mit Keramik- oder Glasbeads empfehlen (73, 101). Tests in der eigenen Arbeitsgruppe zeigten im Vorfeld dieser Arbeit bereits einen besseren Pilzzellaufschluss bei Verwendung von Keramik- im Vergleich zu Glasbeads, weshalb in der vorliegenden Arbeit Keramikbeads verwendet wurden (persönliche Kommunikation). Die freigesetzte DNA-Menge war bei den im Durchmesser größeren Keramikbeads (1,4 mm), höher als bei den Glasbeads (0,1 mm). Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Gruppen, nämlich dass Glasbeads für die Extraktion von Hefe-DNA effizient sind, aber Keramikbeads höhere Ausbeuten für filamentöse Pilze, wie z. B. *Aspergillus*-Hyphen bringen (102, 103).

Da bereits bei den zwei getesteten Pilzen große Unterschiede in der Extraktionseffizienz auftraten, sollte die Wirkung des „Bead beatings“ in Zukunft auch für weitere humanpathogen relevante Pilze, wie z.B. *Cryptococcus* getestet werden. Gerade dieser Pilz zeichnet sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen mechanische Bearbeitung aufgrund einer Kapselschicht auf der Zelloberfläche aus (86). Deshalb war es interessant, genauer zu analysieren, welche Pilzspezies in den klinischen Proben unserer Studie nachweisbar waren, da hier der neu entwickelte Zellaufschluss erstmals verwendet wurde.

Dabei fanden wir *Candida* mit deutlichem Abstand am häufigsten sowohl im respiratorischen Spülwasser als auch in den Blutproben, wobei sich auch seltener auftretende und im Zellaufschluss widerstandsfähigere Gattungen wie *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Aspergillus*, *Fusarium* oder *Penicillium* nachweisen ließen. Da Pilze dieser Gattungen bei der Pilot-Studie, bei der erstmals der klinische Einsatz der fuPCR

getestet wurde, nicht nachgewiesen wurden (57), lässt sich schlussfolgern, dass der verbesserte Zellaufschluss für deren Nachweisbarkeit verantwortlich ist. Pilze aus der Gruppe Mucorales mit Gattungen wie *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Lichtheimia* und *Cunninghamella* wurden wie auch zuvor in der Pilot-Studie nicht detektiert. Dabei bleibt die Frage unbeantwortet, ob es an einem Problem mit der Detektion der DNA dieser Pilze mittels der fuPCR lag, oder ob das untersuchte Probenmaterial für deren Nachweis ungeeignet ist.

Damit gilt es die Frage zu beleuchten, ob sich das in der klinischen Studie verwendete respiratorische Spülwasser für den Nachweis von Pneumonie-assoziierten oder -verursachenden Pilzen grundsätzlich eignet. Dies um so mehr, als die bronchoalveoläre Lavage (BAL) im Vergleich zu anderen respiratorischen Materialien – wie eben dem Rachenspülwasser - zumeist favorisiert wird, da sie aus tieferen Abschnitten des Bronchialbaums mit Zugang zum Alveolarraum gewonnen wird. (20, 104). Bei hämatologisch-onkologischen Patienten, die meist eine mehr oder weniger schwere Thrombozytopenie haben, ist dieser Vorteil gegen das Risiko einer erhöhten Blutungsneigung abzuwägen (105, 106). Bei lege artis Probengewinnung enthält die Rachenspülflüssigkeit auch Beimischungen aus dem Bronchialsekret, weshalb wir in der Risiko-Nutzen-Abwägung die Entscheidung für das respiratorische Spülwasser getroffen haben.

Der Nachweis von Pilzen im respiratorischen Spülwasser spiegelt die Tatsache wider, dass eben viele humanpathogene Pilze ubiquitär in der Umwelt vorkommen und durch Verschleppung von kolonisierten Hautoberflächen (*Candida*, *Trichosporon*,) oder über die Luft als Sporen (*Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) in die oberen Atemwege gelangen können (107-110). Bei immunkompetenten Personen werden diese Erreger durch Enzyme und neutrophile Granulozyten an der Schleimhautbarriere eliminiert (111), während bei immungeschwächten Personen – insbesondere, wenn diese neutropen sind - diese zelluläre Schutzfunktion stark verringert sind (112). Neben der Abnahme der neutrophilen Granulozytenkonzentration (113, 114) haben diese Patienten zusätzlich ein in seiner Zusammensetzung stark verändertes orales und intestinales Mikrobiom, was einen negativen regulatorischen Effekt auf das Immunsystem hat (115, 116). Während also ein kurzfristiges Auftreten der Pilze bei Gesunden unproblematisch ist, (117-122), können diese Erreger bei immungeschwächten Patienten zu lokalen Infektionen führen. Dazu zählen die durch

Trichosporon oder *Aspergillus* verursachten Pneumonien (8-10, 123, 124) oder disseminiert verlaufende Infektionen, wie z.B. durch *Candida*-Arten (125-127). Die Invasion der Pilze ins Blut via Lunge als ist besonders gefährlich und kommt fast ausschließlich bei immunsupprimierten Patienten vor (23, 128, 129). Daher ist für diese Pilze neben der Untersuchung von respiratorischem Spülwasser auch die Analyse von Blutproben indiziert, um festzustellen, ob eine Fungämie und damit eine systemische Infektion vorliegt.

Einer der bemerkenswerten Befunde unserer Studie ist, dass die meisten Pilze im Serum und Blut, nicht aber im Plasma nachzuweisen waren, was auf eine geringere Sensitivität der PCR im Plasma hindeutet. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen, die diesen Unterschied beim Vergleich von Plasma und Vollblut bei Patienten mit Aspergillose gefunden haben (64, 69). Sie führten die geringere Sensitivität der Nachweise aus Plasma im Vergleich zu Vollblut auf einen Verlust von Pilzzellen durch die Zentrifugation bereits bei der Plasmagewinnung zurück. Einige Autoren empfehlen dessen ungeachtet das Plasma für das Screening auf Pilzerreger zu benutzen (65, 130), da die DNA im Plasma bereits frei vorliegt und die Zellen nicht erst aufgeschlossen werden müssen. Auf der Grundlage unserer Ergebnisse favorisieren wir allerdings zur PCR-Analyse Serum und Blut gegenüber dem Plasma. Damit entsprechen wir der von der European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI) formulierten Empfehlung, für die Untersuchung Serum und Vollblut heranzuziehen (73, 101).

Auch wenn wir in unserer Studie keinen Vertreter aus der Gruppe der Mucorales nachweisen konnten, so sind lokale Mucorales-Infektionen der Lunge und disseminierte Infektionsverläufe mit Fungämie bei hämatologischen Patienten beschrieben (131-133). Berücksichtigt man auch, dass Mucorales-DNA bereits in den Atemwegen und Serum nachgewiesen werden konnte (134) spricht dies für die grundsätzlich richtige Wahl unseres Probenmaterials. Bemerkenswert war bei der Evaluierung der TaqMan-Sonden, dass die Amplifikation von Mucorales, insbesondere *Lichtheimia corymbifera*, in der fuPCR C eine geringere Effizienz im Vergleich zur Amplifikation anderer Pilze aufwies, weshalb das Vorkommen von Mucorales-Pilzen in unseren Studienproben nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Es ist deshalb zu erwägen, ob zum besseren Nachweis von Mucorales eine andere Bindungsregion für die PCR-Primer gewählt werden sollte. Dafür sprechen die Ergebnisse einer Arbeit,

in der ein Assay verwendet wurde, (135), der aus der Kombination zweier unabhängiger Sonden-basierter Realtime-PCRs besteht, wobei die eine einen Bereich im 18S- während die andere einen Abschnitt im 28S-Gen abdeckt. Angesichts der erfolgreichen Evaluierung dieses Assays anhand von Gewebe- und Serum-Proben sowie der Übereinstimmung mit dem Amplifikationsprofil der fuPCR bietet dieser Assay einen Ersatz für fuPCR B und C (134)

Als Zwischenfazit kann festgehalten werden, dass sich durch den verbesserten Pilzaufschluss, die Zahl mittels fuPCR nachweisbarer Pilzgattungen im Vergleich zu Kultur- und serologischen Methoden signifikant steigern ließ.

So war bei unseren Untersuchungen *Candida* zwar häufiger durch Kultur als mittels fuPCR-Assay nachweisbar, doch fand sich keine der anderen molekularbiologisch detektierten Pilzgattungen in der Kultur. Gleichwohl wird man angesichts der besseren Detektion von *Candida* mittels Kultur auf diese nicht verzichten, zumal auch die Befunde einer Studie von 2008 unsere Ergebnisse stützen, welche die Kultur als die beste Methode für den Nachweis von *Candida* belegt (16). Über den methodischen Aspekt hinaus bleibt natürlich die Frage nach der klinischen Relevanz eines respiratorischen *Candida*-Nachweises, da *Candida* ein häufiger Bestandteil des menschlichen oralen Mikrobioms ist. So werden 20-50% der gesunden Personen asymptomatisch besiedelt (16), während die Inzidenz bei immunsupprimierten Patienten stark ansteigt. Das bestätigen auch die Resultate unserer klinischen Studie, wohl wissend, dass eine respiratorische Kolonisierung mit *Candida* nicht mit einer manifesten Pilzinfektion einhergehen muss und somit per se auch keine Indikation für eine antimykotische Therapie sein kann (14).

Anders als Kulturverfahren spiegeln serologische Antikörper-Assays die humorale Immunantwort des Körpers gegen einen infektiösen Erreger wider, wobei die Antikörpertiter auch die Folge einer schon länger zurückliegenden Besiedlung oder Infektion sein können (136). In unserer Studie fanden sich bei den gesunden Probanden - wenn auch mit niedrigen Titern – so doch häufiger positive Titer gegen *Candida* und *Aspergillus* als bei hämatologischen Patienten. Wir deuten die niedrigen Antikörpertiter der gesunden Probanden im Sinne eines „immunologischen Grundrauschens“, welches bei hämatologischen Patienten aufgrund ihrer individuell unterschiedlich kompromittierten Immunität mehr oder weniger abgenommen hat oder gar erloschen ist (45, 46). Vor diesem Hintergrund ist die klinische Relevanz positiver

Candida- und *Aspergillus*-Antikörper-Assays bei immunsupprimierten bestenfalls als marginal einzustufen.

Demgegenüber wird der Nachweis von Pilzantigenen bei immunsupprimierten Patienten als für die Diagnose von invasiver Aspergillose und Candidiasis nützlich bewertet (137, 138). So zeigten die Daten einer retrospektiven Studie, dass sich in den Seren von Patienten mit invasiver Aspergillose bereits 39 Tage vor deren Tod eine invasive Aspergillose in Gestalt eines positiven Galactomannan-Antigen-Tests widerspiegelte. So entsprechen deren Befunde insofern auch unseren Resultaten, als Pilzantigene nur bei immunsupprimierten Personen nachweisbar waren.

Wie schon oben ausgeführt, ließen sich über die Kultur und serologischen Assays hinaus in dieser Studie bei Patienten mittels fuPCR-Assay auch seltene Spezies wie *Trichosporon*, *Cryptococcus* und *Fusarium* im respiratorischen Spülwasser und Blut nachgewiesen, weshalb auch aufgrund der durch andere Arbeitsgruppen geschaffenen Datenlage für den Nachweis von Pilzen, die nicht der Gattung *Candida* angehören, molekularbiologische Methoden wie die PCR empfohlen werden (108, 109, 118, 139). So gelang in unserer klinischen Studie der Nachweis von *Cryptococcus* nur mittels fuPCR-Assay, jedoch nicht mittels Antigen-Test. Dies mag sich damit erklären, dass der in dieser Studie verwendete *Cryptococcus*-Antigen-Lateral-Flow-Tests (CrAg LFA) einen hohen Antigentiter ($\geq 1:20$) erfordert, wie er bei einer akuten Infektion mit *Cryptococcus* vorkommt, um positiv zu werden (140, 141), während für die fuPCR bereits geringe Mengen an *Cryptococcus*-DNA für die Amplifikation ausreichen (57).

Selbstverständlich bedarf es bei der Interpretation der Ergebnisse des fuPCR-Assays – wie auch prinzipiell für Kultur- und serologische Test - immer einer ganzheitlichen Betrachtung des Patienten. Zu berücksichtigen sind dabei insbesondere die klinischen Beschwerden und Symptome sowie eine Vielzahl von Laborparametern unter besonderer Würdigung der entzündlichen Parameter wie dem CRP. Die Ergebnisse bildgebender Verfahren wie dem hochauflösenden CT der Lunge und des Abdomens spielen eine herausragende Rolle für die Diagnose einer invasiven Mykose sowie der klinische Zustand des Patienten. Diese ganzheitliche Betrachtung ist angesichts einer sehr sensitiven fuPCR, die eine Vielzahl unterschiedlicher Pilze zu detektieren vermag, unverzichtbar, da auch apathogene Spezies molekularbiologisch aufspürbar sind. Ein Beispiel dafür ist in der Studie der Nachweis von *Saccharomyces cerevisiae* im

respiratorischen Spülwasser in gleicher Menge bei Patienten und Gesunden, was sehr wahrscheinlich auf die darin enthaltende Pilz-DNA zurückzuführen ist. In völliger Übereinstimmung mit anderen Autoren bewerten wir *S. cerevisiae* als apathogen (142), zumal dieser auf der Oberfläche von Früchten vorkommt (143) und für die Brotherstellung eingesetzt wird (144), mithin also beim Verzehr von Nahrungsmitteln aufgenommen wird. Abgesehen von *S. cerevisiae* gab es einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit eines Pilznachweises und dem Immunstatus der Personen, insofern als die Nachweishäufigkeit bei Gesunden niedriger lag als bei Patienten und mit zunehmender Immunsuppression während der Konditionierung weiter anstieg. Dieser Befund mag die fortschreitende Schwächung und Zerstörung des Immunsystems widerspiegeln und das stark erhöhte Risiko für invasive Pilzinfektion erklären (145-149).

Ganz aktuell werden Metagenomsequenzierungen zu diagnostischen Zwecken ins Spiel gebracht, um „mit einem Schlag“ alle in einer Probe vorkommenden Mikroorganismen, Bakterien und Eukaryonten wie Pilze zu identifizieren. Dabei zeigte sich, dass der Pilz-Anteil am gesamten respiratorischen Mikrobiom (Metagenom) – wie schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben - nur ca. 1% ausmacht (157, 158). In unserer Arbeit wurde die Metagenomsequenzierung an einzelnen respiratorischen Proben vergleichend eingesetzt, wobei sich alle per fuPCR-Assay detektierten Pilze wiederfanden. Darüber hinaus waren per Metagenomsequenzierung zusätzlich viele zumeist apathogene Pilze nachweisbar, weshalb sie sich – nicht zuletzt auch wegen ihrer sehr hohen Sensitivität - für eine Routinediagnostik klinisch relevanter Pilzerreger noch nicht anbietet. Gegen einen solchen Einsatz sprechen auch der fehlende Auswertalgorithmus, die hohen Kosten und langen Bearbeitungszeiten. So ist ein Nachweis mittels fuPCR innerhalb von 6 Stunden im Vergleich zu mindestens 72 Stunden mit der WGS möglich. Außerdem erfolgt schon vor Sequenzierung der PCR-Produkte eine Beschränkung auf die Pilzart einer Gruppe (*Aspergillus* (Reaktion A) / *Candida* (G) / Mucorales (B+C)). Nach Bestimmung der Spezies durch Sanger-Sequenzierung kann das Antimykotikum falls notwendig spezifisch angepasst werden, ohne dass eine aufwändige bioinformatische Prozessierung notwendig wäre.

Durch die Umstellung von SYBRGreen- auf Sonden-basierte TaqMan-PCRs lässt sich die fuPCR weiter verbessern. Die bisherigen Bemühungen, Sonden-basierte PCR-Ansätze für die Detektion von Pilz-Pathogenen zu entwickeln, beschränkten sich

zumeist auf nicht-invasive Pilze wie die Dermatophyten (150-152) oder auf Sonden, die sich nur für den Nachweis bestimmter Gattungen wie *Aspergillus* oder *Candida* eignen (153-155). Demgegenüber bieten die in dieser Arbeit entwickelten TaqMan-Sonden durch ihre Bindung an einen hochkonservierten Bereich in der ITS-2 Region die Möglichkeit, ein breites Spektrum an Pilzen innerhalb der fuPCR Reaktionen zu erfassen. Der Nutzen eines solchen TaqMan-Sonden-basierten Ansatzes der fuPCR zeigte sich bei einem Patienten mit Hodgkin-Lymphom, bei dem sich retrospektiv *Trichosporon asahii* nachweisen ließ und so der Verdacht auf eine disseminierte Infektion mit diesem Erreger bestätigt werden konnte (156). Im Vergleich zur herkömmlichen Diagnostik-Methode mittels Kultivierung und anschließender Analyse mit MALDI-TOF konnte mittels fuPCR-Assay die Gattung *Trichosporon* nicht nur aus der Pilzkultur, sondern schon aus dem EDTA-Blut als Primärmaterial identifiziert werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse führen zu einer signifikanten Verbesserung der fuPCR sowohl durch einen gesteigerten Aufschluss der Pilz-DNA mittels „Bead beating“ als auch durch eine optimierte Auswertbarkeit mittels TaqMan-Sonden. Im Vergleich zur Pilot-Studie, in der die fuPCR noch ohne den durch „Bead beating“ verbesserten Aufschluss getestet wurde, konnten in der hier durchgeführten Studie durch „Bead beating“ der Patientenproben, Pilze der Gattungen *Cryptococcus*, *Trichosporon* und *Fusarium* detektiert werden (57). Die Früherkennung gerade dieser Pilze im Respirationstrakt ist von großer Bedeutung, da sie bei immunsupprimierten Personen, wie z.B. Leukämie-Patienten, in der Lage sind von dort den Organismus invasiv zu befallen. *Cryptococcus* kann auf diesem Wege zu einer lebensbedrohlichen Meningitis führen, während *Trichosporon* und *Fusarium* disseminierte Fungämien auslösen können, die mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden sind (157-159). Der fuPCR-Assay könnte auch für die Pilzdiagnostik bei anderen immunsupprimierten Patienten nützlich sein. Dazu zählen Patienten nach jedweder allogenen Organtransplantation, Patienten mit einer HIV (Human immune deficiency syndrome) Infektion, Diabetes mellitus, oder autoimmunologischen Grunderkrankungen, die einer lang dauernden immunsuppressiven Therapie bedürfen. (160). Daher sehe ich eine Verbesserung der zukünftigen Pilzdiagnostik darin, den fuPCR-Assay mit den bisherigen Methoden des serologischen Nachweises und der Kultur zu kombinieren, eine Einschätzung, die in guter Übereinstimmung mit der Literatur ist (39, 45, 54, 161, 162). Außerdem bietet der fuPCR-Assay das methodische Werkzeug ein

Frühwarnsystem zu etablieren, indem es das Ausmaß einer Pilzbelastung bei Hochrisikopatienten abzuschätzen erlaubt und so in einem prophylaktischen Sinn den Beginn einer antimykotischen Behandlung triggert, bevor es zur Manifestation einer invasiven Pilzinfektionen gekommen ist.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der Pilzdiagnostik für Patienten mit hämatologischen Neoplasien. Dafür wurde ein Assay von Multiplex Realtime-PCR-Reaktionen genutzt, welches unter der Bezeichnung „fuPCR“ ein Spektrum von mehr als 20 klinisch relevanten Pilzarten in einem einzigen Durchlauf differenzieren kann.

Im ersten Schritt wurde das diagnostische Routineprotokoll für die Präparation von Hefen und Schimmelpilzen, welches eine Behandlung mit flüssigem Stickstoff, einer Proteinase K Lyse sowie die DNA-Aufreinigung mit dem „EZ1-DNA-Tissue-Kit“ und dem EZ1-BioRobot umfasste, um mechanisches „Bead beating“ erweitert. Einmaliges „Bead beating“, gefolgt von Proteinase K Lyse und EZ1-Aufarbeitung führte zu der höchsten DNA-Freisetzung aus Pilzen in einer Puffer-Lösung. Diese Methode erhöhte die extrahierte DNA-Menge im Vergleich zur alleinigen EZ1-Aufarbeitung von *C. glabrata* um das 100-fache und von *A. fumigatus* um das 10-fache. In respiratorischem Spülwasser und Blut wurde die größte Steigerung an DNA-Freisetzung mit dreifachem „Bead beating“ unter gleichzeitiger Proteinase K Lyse gemessen. Die DNA-Freisetzung von *C. glabrata* stieg im respiratorischen Spülwasser um das > 100-fache und im Blut um das > 1000-fache und von *A. fumigatus* um das > 10-fache im respiratorischen Spülwasser und im Blut um das 5- bis 10-fache. Diese Ergebnisse belegen recht eindrucksvoll die hohe Effizienz des „Bead beating“ für die DNA-Extraktion und gleichzeitig auch, dass eine Behandlung der Proben mit flüssigem Stickstoff entbehrlich ist.

Die Vorteile eines verbesserten DNA-Aufschlusses für den fuPCR-Assay wurden daraufhin in einer klinischen Studie untersucht. Dazu wurden Proben aus respiratorischem Spülwasser, antikoaguliertem EDTA-Vollblut, Serum und Plasma von 94 Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen und 40 gesunden Kontroll-Probanden gesammelt und mittels Kultivierung auf Agarplatten, serologischer Diagnosemethoden sowie dem fuPCR-Assay auf die Präsenz von Pilzen untersucht. Der Nachweis von Pilzen der Gattung *Candida* war besonders durch die Kultivierung von respiratorischem Spülwasser sowie durch positive Antikörper-Nachweise im Serum sowohl bei den Patienten (61% bzw. 47%) als auch in der Kontrollgruppe (29% bzw. 51%) möglich. Der diagnostische Nutzen des durch den optimierten Aufschluss verbesserten fuPCR-Assays zeigte sich darin, nun auch andere pathogene Hefen, wie

Cryptococcus und *Trichosporon* sowie Schimmelpilze, wie *Fusarium*, aufspüren zu können. Diese Pilzspezies ließen sich im respiratorischen Spülwasser als auch im Vollblut und Serum ausschließlich bei Patienten nachweisen.

Eine weitere Verbesserung der fuPCR wurde durch die Entwicklung von TaqMan-Sonden erreicht. Die Sonde Pan-S wurde so konzipiert, dass sie für die Reaktionen A, D, E, F und G verwendet werden kann. Durch die Entwicklung der drei Varianten von Pan-S, Rhizo-S, Absgla-S und Lichchor-S, konnten auch die Reaktionen B und C als TaqMan-Ansatz durchgeführt werden, wodurch eine erhöhte Spezifität der Reaktionen erzielt werden konnte. Der damit verbundene Verlust an Sensitivität konnte durch die verbesserte Auswertbarkeit kompensiert werden, so dass es per Saldo zu keiner Änderung des Detektionslimits für die Reaktionen gekommen ist. So waren Linearität und Effizienz der Amplifikation mit Sonde gleichwertig oder sogar besser als ohne diese. Nicht zuletzt da sich die Sonden-basierte fuPCR für die Detektion von Pilzen in klinischen Probenmaterialien bereits als geeignet erwiesen hat, favorisieren wir für die fuPCR die Umstellung von einem SYBRGreen-basierten auf einen TaqMan-basierten Ansatz.

In der Zusammenschau betrachte ich den optimierten fuPCR-Assay als eine wertvolle Ergänzung zu den etablierten Methoden der Pilzdetektion, insbesondere was die ansonsten nur schwer detektierbaren Pilz-Spezies wie *Cryptococcus*, *Trichosporon* und *Fusarium* betrifft. Neben einer verbesserten Diagnostik im Erkrankungsfall erlaubt die fuPCR aufgrund ihrer hohen Sensitivität die Früherkennung dieser pathologisch relevanten Pilze. Diese spielen besonders bei schwer immundefizienten Patienten, wie denen mit hämatologischen Neoplasien, eine nicht zu unterschätzende Rolle und bedürfen einer möglichst frühzeitigen und Spezies-spezifischen Therapie. Deshalb plädiere ich für die Einführung des fuPCR-Assay mit dem verbesserten Aufschlussverfahren in die mykologische Routinediagnostik. Für eine rationale Bewertung des finanziellen und personellen Ressourcen-Aufwands mit dem erwartbaren Nutzen, sollte festgelegt werden, zu welchem Zeitpunkt innerhalb des Therapieverlaufs eine solche erweiterte Diagnostik indiziert ist. Aus meiner Sicht böte es sich an, ein erstes Probenset – bestehend aus Rachenspülflüssigkeit und Vollblut - vor Beginn einer zytostatischen Behandlung zu gewinnen und danach ein weiteres in der Phase des Zellnadirs, ganz gleich, ob der Patient asymptomatisch ist oder Zeichen einer Infektion zeigt, zu gewinnen. Im letzteren Falle ist eine solche Probennahme

ohnehin angezeigt. Über das rein mikrobielle diagnostische Rüstzeug hinaus, wird die immer subtilere Bildgebung mit der Möglichkeit einer auf dem Einsatz von künstlicher Intelligenz basierenden Auswertung mittels maschinellen Lernens zu einer höheren Spezifität bei der Pilzdiagnostik führen. Diese Entwicklungen gilt es im Sinne einer interdisziplinären Gesamtschau zu bündeln.

6. Summary

The aim of this work was to optimise fungal diagnostics for patients with hematologic neoplasms. For this purpose, an assay of multiplex real-time PCR reactions was used which has been established as "fuPCR" and which can differentiate a spectrum of more than 20 clinically relevant fungal species in a single run.

In the first step, the routine diagnostic protocol for yeast and mould preparation, which included liquid nitrogen treatment, proteinase K lysis, and DNA purification using the "EZ1 DNA Tissue Kit" and the EZ1 BioRobot, was extended to include mechanical bead beating. Single "bead beating" followed by proteinase K lysis and EZ1 purification resulted in the highest DNA release from fungi in buffer solution. This method increased the amount of DNA extracted 100-fold from *C. glabrata* and 10-fold from *A. fumigatus* compared to EZ1 purification alone. In respiratory rinse and blood, the largest increase in DNA release was measured with triple "bead beating" and simultaneous proteinase K lysis. DNA release from *C. glabrata* increased > 100-fold in respiratory lavage water and > 1000-fold in blood, and from *A. fumigatus* increased > 10-fold in respiratory lavage water and 5- to 10-fold in blood. These results demonstrate quite impressively the high efficiency of "bead beating" for DNA extraction and at the same time also that treatment of the samples with liquid nitrogen is dispensable.

The advantages of improved specimen digestion for the optimised fuPCR assay were then investigated in a clinical study. For this purpose, samples were collected from respiratory lavage water, anticoagulated EDTA whole blood, serum, and plasma from 94 patients with underlying hematologic diseases and 40 healthy control subjects and examined for the presence of fungi using cultivation on agar plates, serological diagnostic methods, and the fuPCR assay. Detection of fungi of the genus *Candida* was particularly possible by culturing respiratory rinse water and by positive antibody detection in serum in both patients (61% and 47%, respectively) and the control group (29% and 51%, respectively). The diagnostic benefit of the fuPCR assay, which was improved by the optimised digestion, was shown to now be able to detect other pathogenic yeasts, such as *Cryptococcus* and *Trichosporon*, as well as moulds, such as *Fusarium*. These fungal species could be detected in respiratory rinse water as well as in whole blood and serum from patients only.

Further improvement of fuPCR was achieved by the development of TaqMan probes. The Pan-S probe was designed to be used for reactions A, D, E, F, and G. The development of the three variants of Pan-S, Rhizo-S, Absgla-S, and Lichchor-S, also allowed reactions B and C to be performed as TaqMan approaches, resulting in increased specificity of the reactions. The associated loss of sensitivity was compensated by the improved evaluability, so that on balance there was no change in the detection limit for the reactions. Thus, linearity and efficiency of amplification with the TaqMan probes were equivalent or even better than without. Finally, since probe-based fuPCR was shown to be suitable for the detection of fungi in clinical sample materials, we favour switching from a SYBRGreen-based to a TaqMan-based approach for fuPCR.

In summary, I consider the optimised fuPCR assay to be a valuable addition to established methods of fungal detection, especially with regard to otherwise difficult to detect fungal species such as *Cryptococcus*, *Trichosporon* and *Fusarium*. In addition to improved diagnostics in case of disease, the optimised fuPCR allows early detection of these pathologically relevant fungi due to its high sensitivity. These fungi play a role that should not be underestimated, especially in severely immunodeficient patients, such as those with hematologic neoplasms, and require therapy that is as early as possible and as species-specific as possible. Therefore, I advocate the introduction of the fuPCR assay with the improved digestion procedure into routine mycological diagnostics. For a rational evaluation of the financial and human resource expenditure with the expected benefit, it should be determined at which point in the course of therapy such an extended diagnostic is indicated. In my view, it would be appropriate to obtain a first set of samples - consisting of pharyngeal lavage fluid and whole blood - before the start of cytostatic treatment and then another in the cell nadir phase, independently whether the patient is asymptomatic or shows signs of infection. In the latter case, such action is indicated anyway. Beyond the purely microbial diagnostic armamentarium, the increasingly subtle imaging with the possibility of evaluation based on the use of artificial intelligence by means machine learning will lead to a higher specificity in fungal diagnosis. These developments must be bundled in the sense of an overarching interdisciplinary view.

7. Literaturverzeichnis

1. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland). 2017;3(4).
2. Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2017;1508:17-65.
3. Webb BJ, Ferraro JP, Rea S, Kaufusi S, Goodman BE, Spalding J. Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network. *Open forum infectious diseases*. 2018;5(8):ofy187.
4. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*. 2012;4(165):165rv13.
5. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50(8):1101-11.
6. Robin C, Cordonnier C, Sitbon K, Raus N, Lortholary O, Maury S, et al. Mainly Post-Transplant Factors Are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study from the Surveillance des Aspergilloses Invasives en France and Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018.
7. Markowski J, Helbig G, Widziszowska A, Likus W, Kyrzcz-Krzemień S, Jarosz U, et al. Fungal colonization of the respiratory tract in allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplant recipients: a study of 573 transplanted patients. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2015;21:1173-80.
8. Sethi P, Saluja R, Jindal N, Singh V. Invasive aspergillosis in an immunocompetent host. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2012;16(2):297-300.
9. Garcia-Giraldo AM, Mora BL, Loaiza-Castano JM, Cedano JA, Rosso F. Invasive fungal infection by *Aspergillus flavus* in immunocompetent hosts: A case series and literature review. *Medical mycology case reports*. 2019;23:12-5.
10. von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive Fungal Infection. *Dtsch Arztebl International*. 2019;116(16):271-8.
11. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(4):695-704.
12. Kanjanapradit K, Kosjerina Z, Tanomkiat W, Keeratichananont W, Panthuwong S. Pulmonary Cryptococcosis Presenting With Lung Mass: Report of 7 Cases and Review of Literature. *Clinical medicine insights Pathology*. 2017;10:1179555717722962.
13. Ramirez I, Hidron A, Cardona R. Successful treatment of pulmonary invasive fungal infection by *Penicillium non-marneffeii* in lymphoblastic lymphoma: case report and literature review. *Clinical case reports*. 2018;6(6):1153-7.
14. De Pascale G, Antonelli M. *Candida* colonization of respiratory tract: to treat or not to treat, will we ever get an answer? *Intensive Care Medicine*. 2014;40(9):1381-4.
15. Azoulay E, Timsit JF, Tafflet M, de Lassence A, Darmon M, Zahar JR, et al. *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent *Pseudomonas ventilator-associated pneumonia*. *Chest*. 2006;129(1):110-7.
16. Pendleton KM, Dickson RP, Newton DW, Hoffman TC, Yanik GA, Huffnagle GB. Respiratory Tract Colonization by *Candida* species Portends Worse Outcomes in Immunocompromised Patients. *Clin Pulm Med*. 2018;25(6):197-201.
17. Meersseman W, Lagrou K, Spriet I, Maertens J, Verbeken E, Peetermans WE, et al. Significance of the isolation of *Candida* species from airway samples in critically ill patients: a prospective, autopsy study. *Intensive Care Med*. 2009;35(9):1526-31.
18. Kulkarni AA, Aruni A, Rastogi P, Rana S, Gupta R. Invasive aspergillosis causing gastric necrosis and perforation: A case report. *JGH open : an open access journal of gastroenterology and hepatology*. 2020;4(1):90-3.

19. Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: Diagnosis & clinical management. *Indian Journal of Medical Research*. 2014;139(FEB):195-204.
20. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, 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. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2008;46(12):1813-21.
21. Gago S, Overton NLD, Ben-Ghazzi N, Novak-Frazer L, Read ND, Denning DW, et al. Lung colonization by *Aspergillus fumigatus* is controlled by ZNF77. *Nature Communications*. 2018;9(1):3835.
22. Gago S, Denning DW, Bowyer P. Pathophysiological aspects of *Aspergillus* colonization in disease. *Medical mycology*. 2018;57(Supplement_2):S219-S27.
23. Pendleton KM, Huffnagle GB, Dickson RP. The significance of *Candida* in the human respiratory tract: our evolving understanding. *Pathogens and disease*. 2017;75(3).
24. Ruhnke M, Böhme A, Buchheidt D, Cornely O, Donhuijsen K, Einsele H, et al. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology—guidelines from the Infectious Diseases Working Party in Haematology and Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (AGIHO). *Annals of Oncology*. 2011;23(4):823-33.
25. Cortes JA, Reyes P, Gomez C, Buitrago G, Leal AL. Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. *Revista iberoamericana de micologia*. 2011;28(2):74-8.
26. Wu GX, Khojabekyan M, Wang J, Tegtmeier BR, O'Donnell MR, Kim JY, et al. Survival following lung resection in immunocompromised patients with pulmonary invasive fungal infection. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2016;49(1):314-20.
27. Young AY, Leiva Juarez MM, Evans SE. Fungal Pneumonia in Patients with Hematologic Malignancy and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinics in chest medicine*. 2017;38(3):479-91.
28. Song Z, Papanicolaou N, Dean S, Bing Z. Localized candidiasis in kidney presented as a mass mimicking renal cell carcinoma. *Case reports in infectious diseases*. 2012;2012:953590.
29. Fiore M, Cascella M, Bimonte S, Maraolo AE, Gentile I, Schiavone V, et al. Liver fungal infections: an overview of the etiology and epidemiology in patients affected or not affected by oncohematologic malignancies. *Infection and drug resistance*. 2018;11:177-86.
30. Black JT. Cerebral candidiasis: case report of brain abscess secondary to *Candida albicans*, and review of literature. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1970;33(6):864-70.
31. Andriole VT. Infections with *Aspergillus* species. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1993;17 Suppl 2:S481-6.
32. Lyratzopoulos G, Ellis M, Nerringer R, Denning DW. Invasive Infection due to *Penicillium* Species other than *P. marneffei*. *Journal of Infection*. 2002;45(3):184-95.
33. Swoboda-Kopec E, Wroblewska MM, Rokosz A, Luczak M. Mixed bloodstream infection with *Staphylococcus aureus* and *Penicillium chrysogenum* in an immunocompromised patient: case report and review of the literature. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2003;9(11):1116-7.
34. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2007;26(6):377-84.
35. Gupta A, Gupta A, Varma A. *Candida glabrata* candidemia: An emerging threat in critically ill patients. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 2015;19(3):151-4.
36. Dabas Y, Bakhshi S, Xess I. Fatal Cases of Bloodstream Infection by *Fusarium solani* and Review of Published Literature. *Mycopathologia*. 2016;181(3-4):291-6.

37. Kruger W, Vielreicher S, Kapitan M, Jacobsen ID, Niemiec MJ. Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease. *Pathogens* (Basel, Switzerland). 2019;8(2).
38. Alves IA, Savi FM, de Vasconcelos CBJ, Jose Quintans Junior L, Serafini MR. The Patenting and Technological Trends in Candidiasis Treatment: A Systematic Review (2014-2018). *Current topics in medicinal chemistry*. 2019.
39. Kozel TR, Wickes B. Fungal diagnostics. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(4):a019299.
40. Branda JA, Ferraro MJ, Kratz A. Sensitivity of peripheral blood smear review for the diagnosis of *Candida* fungemia. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(1):97-101.
41. Hage CA, Carmona EM, Epelbaum O, Evans SE, Gabe LM, Haydour Q, et al. Microbiological Laboratory Testing in the Diagnosis of Fungal Infections in Pulmonary and Critical Care Practice. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2019;200(5):535-50.
42. Li FQ, Ma CF, Shi LN, Lu JF, Wang Y, Huang M, et al. Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against *Candida* enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia. *BMC infectious diseases*. 2013;13:253.
43. Li H, Rui Y, Zhou W, Liu L, He B, Shi Y, et al. Role of the *Aspergillus*-Specific IgG and IgM Test in the Diagnosis and Follow-Up of Chronic Pulmonary Aspergillosis. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:1438.
44. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(3):465-84.
45. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(3):490-526.
46. Richardson M, Page I. Role of Serological Tests in the Diagnosis of Mold Infections. *Current fungal infection reports*. 2018;12(3):127-36.
47. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2015;2015(12):Cd007394.
48. Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert review of anti-infective therapy*. 2009;7(10):1201-21.
49. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2000;38(8):3016-21.
50. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1993;31(3):615-21.
51. Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(3):906-14.
52. Van Burik J-A, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR Assay for Detection of Fungal Infection in Human Blood Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(5):1169-75.
53. Valero C, de la Cruz-Villar L, Zaragoza Ó, Buitrago MJ. New Panfungal Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(12):2910-8.
54. Kidd SE, Chen SC-A, Meyer W, Halliday CL. A New Age in Molecular Diagnostics for Invasive Fungal Disease: Are We Ready? *Frontiers in microbiology*. 2020;10(2903).
55. Hope W, Natarajan P, Goodwin L. Invasive fungal infections. *Clinical medicine (London, England)*. 2013;13(5):507-10.
56. Romanelli AM, Fu J, Herrera ML, Wickes BL. A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. *Mycoses*. 2014;57(10):612-22.
57. Rahn S, Schuck A, Kondakci M, Haas R, Neuhausen N, Pfeffer K, et al. A novel comprehensive set of fungal Real time PCR assays (fuPCR) for the detection of fungi in immunocompromised haematological patients—A pilot study. *International Journal of Medical Microbiology*. 2016;306(8):611-23.

58. Rodrigues P, Venâncio A, Lima N. Toxic reagents and expensive equipment: are they really necessary for the extraction of good quality fungal DNA? *Letters in Applied Microbiology*. 2018;66(1):32-7.
59. Haydour Q, Hage CA, Carmona EM, Epelbaum O, Evans SE, Gabe LM, et al. Diagnosis of Fungal Infections. A Systematic Review and Meta-Analysis Supporting American Thoracic Society Practice Guideline. *Annals of the American Thoracic Society*. 2019;16(9):1179-88.
60. Sanguinetti M, Posteraro B, Beigelman-Aubry C, Lamoth F, Dunet V, Slavin M, et al. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2019;74(Suppl 2):ii27-ii37.
61. Tiew PY, Mac Aogain M, Ali NATBM, Thng KX, Goh K, Lau KJX, et al. The Mycobiome in Health and Disease: Emerging Concepts, Methodologies and Challenges. *Mycopathologia*. 2020;185(2):207-31.
62. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. *Nature reviews Genetics*. 2019;20(6):341-55.
63. Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14:163.
64. McCulloch E, Ramage G, Jones B, Warn P, Kirkpatrick WR, Patterson TF, et al. Don't throw your blood clots away: use of blood clot may improve sensitivity of PCR diagnosis in invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Pathology*. 2009;62(6):539-41.
65. Lau A, Halliday C, Chen SC, Playford EG, Stanley K, Sorrell TC. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J Clin Microbiol*. 2010;48(3):811-6.
66. Springer J, Morton CO, Perry M, Heinz WJ, Paholcsek M, Alzheimer M, 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):1445-50.
67. Vingataramin L, Frost EH. A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *BioTechniques*. 2015;58(3):120-5.
68. Karakousis A, Tan L, Ellis D, Alexiou H, Wormald PJ. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of microbiological methods*. 2006;65(1):38-48.
69. Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38(10):3830-3.
70. Haugland RA, Brinkman N, Vesper SJ. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *Journal of microbiological methods*. 2002;50(3):319-23.
71. White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;42(4):479-86.
72. White PL, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, et al. Evaluation of *Aspergillus* PCR protocols for testing serum specimens. *J Clin Microbiol*. 2011;49(11):3842-8.
73. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B, et al. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1231-40.
74. Barnes RA, White PL, Morton CO, Rogers TR, Cruciani M, Loeffler J, et al. Diagnosis of aspergillosis by PCR: Clinical considerations and technical tips. *Medical mycology*. 2018;56(suppl_1):60-72.
75. Möbius N, Brenneisen W, Schaeffer A, Henrich B. Protocol for the rapid detection of the urogenital tract mollicutes and Chlamydia with concomitant LGV-(sub)typing. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2012;903:235-53.
76. Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, van Rooyen MA, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1220-3.

77. Rahn S. Identifizierung und Epidemiologie von Pilzerregern bei immunsupprimierten Patienten mittels moderner molekularbiologischer Methoden: Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2018.
78. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J, Innis M, Gelfand D, et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. 311990. p. 315-22.
79. Nadeem SG, Hakim ST, Kazmi SU. Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of Candida species directly from clinical specimens in resource-limited settings. The Libyan journal of medicine. 2010;5.
80. BLAST-Database. nr/nt BLAST-Database. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
81. CBS-Database. CBS-Database of the Westerdijk Institute, Netherlands. <http://www.wiknawnl/Collections/>.
82. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical chemistry. 2009;55(4):611-22.
83. Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW. Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? Trends in microbiology. 2005;13(2):58-63.
84. Hohnadel M, Felden L, Fijuljanin D, Jouette S, Chollet R. A new ultrasonic high-throughput instrument for rapid DNA release from microorganisms. Journal of microbiological methods. 2014;99:71-80.
85. Starke R, Jehmlich N, Alfaro T, Dohnalkova A, Capek P, Bell SL, et al. Incomplete cell disruption of resistant microbes. Scientific reports. 2019;9(1):5618.
86. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. Microbiology spectrum. 2017;5(3).
87. Reichard U, Buchheidt D, Lass-Flörl C, Loeffler J, Lugert R, Ruhnke M, et al. Interlaboratory comparison of PCR-based identification of Candida and Aspergillus DNA in spiked blood samples. Mycoses. 2012;55(5):426-34.
88. Serna-Dominguez MG, Andrade-Michel GY, Arredondo-Bernal HC, Gallou A. Two efficient methods for isolation of high-quality genomic DNA from entomopathogenic fungi. Journal of microbiological methods. 2018;148:55-63.
89. Gontia I, Tripathi N, Tiwari S. A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies 2014. 536-9 p.
90. Amer OE, Mahmoud MA, El-Samawaty ARMA, Sayed SRM. Non liquid nitrogen-based-method for isolation of DNA from filamentous fungi. Afr J Biotechnol. 2011;10(65):14337-41.
91. Cheng F, Hou L, Woeste K, Shang Z, Peng X, Zhao P, et al. Soil pretreatment and fast cell lysis for direct polymerase chain reaction from forest soils for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of fungal communities. Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 2016;47(4):817-27.
92. Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR, Wilks M, Millar MR, Agrawal SG. Comparison of DNA extraction methods for Aspergillus fumigatus using real-time PCR. Journal of medical microbiology. 2006;55(Pt 9):1187-91.
93. Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Applied and environmental microbiology. 1999;65(11):4715-24.
94. Leite GM, Magan N, Medina A. Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: an optimized method for filamentous fungi. Journal of microbiological methods. 2012;88(3):413-8.
95. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. J Clin Microbiol. 2005;43(10):5122-8.
96. Beauvais A, Latge JP. Special Issue: Fungal Cell Wall. Journal of fungi (Basel, Switzerland). 2018;4(3).
97. van Burik JA, Schreckhise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. Medical mycology. 1998;36(5):299-303.

98. Velegraki A, Kambouris M, Kostourou A, Chalevelakis G, Legakis NJ. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. *Medical mycology*. 1999;37(1):69-73.
99. Jin J, Lee YK, Wickes BL. Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2004;42(9):4293-6.
100. Brown E, Price F, Holmes C, Patel D, Perera N. Optimisation of *Aspergillus* DNA extraction from simulated samples and clinical serum and bronchoalveolar lavage samples, as a precursor to commercial PCR assay consideration for routine service, in an NHS clinical diagnostic microbiology laboratory. *ECCMID 29th* (2019). 2019.
101. White PL, Perry MD, Loeffler J, Melchers W, Klingspor L, Bretagne S, et al. Critical stages of extracting DNA from *Aspergillus fumigatus* in whole-blood specimens. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3753-5.
102. de Boer R, Peters R, Gierveld S, Schuurman T, Kooistra-Smid M, Savelkoul P. Improved detection of microbial DNA after bead-beating before DNA isolation. *Journal of microbiological methods*. 2010;80(2):209-11.
103. Jeddi F, Piarroux R, Mary C. Application of the NucliSENS easyMAG system for nucleic acid extraction: optimization of DNA extraction for molecular diagnosis of parasitic and fungal diseases. *Parasite (Paris, France)*. 2013;20:52.
104. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2019.
105. Leiten EO, Martinsen EM, Bakke PS, Eagan TM, Gronseth R. Complications and discomfort of bronchoscopy: a systematic review. *European clinical respiratory journal*. 2016;3:33324.
106. Cefalo M, Puxeddu E, Sarmati L, Paterno G, Fontana C, Nasso D, et al. Diagnostic Performance and Safety of Bronchoalveolar Lavage in Thrombocytopenic Haematological Patients for Invasive Fungal Infections Diagnosis: A Monocentric, Retrospective Experience. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2019;11(1):e2019065.
107. Velagapudi R, Hsueh Y-P, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as Infectious Propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 2009;77(10):4345-55.
108. van Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, van der Lee TAJ, Waalwijk C. Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. *Current fungal infection reports*. 2015;9(3):135-43.
109. Rivera V, Gaviria M, Muñoz-Cadavid C, Cano L, Naranjo T. Validation and clinical application of a molecular method for the identification of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* complex DNA in human clinical specimens. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2015;19(6):563-70.
110. Mariné M, Brown NA, Riaño-Pachón DM, Goldman GH. On and Under the Skin: Emerging Basidiomycetous Yeast Infections Caused by *Trichosporon* Species. *PLoS Pathog*. 2015;11(7):e1004982.
111. Demirezen Ş, Dönmez HG, Özcan M, Beksaç MS. Evaluation of the relationship between fungal infection, neutrophil leukocytes and macrophages in cervicovaginal smears: Light microscopic examination. *Journal of cytology*. 2015;32(2):79-84.
112. Shariati A, Moradabadi A, Chegini Z, Khoshbayan A, Didehdar M. An Overview of the Management of the Most Important Invasive Fungal Infections in Patients with Blood Malignancies. *Infection and drug resistance*. 2020;13:2329-54.
113. José RJ, Periselneris JN, Brown JS. Opportunistic bacterial, viral and fungal infections of the lung. *Medicine (Abingdon, England : UK ed)*. 2020;48(6):366-72.
114. Eades CP, Armstrong-James DPH. Invasive fungal infections in the immunocompromised host: Mechanistic insights in an era of changing immunotherapeutics. *Medical mycology*. 2019;57(Supplement_3):S307-S17.
115. Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beauvils F, Wieërs G, Guery B, et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020;10:9.

116. Zama D, Bossù G, Leardini D, Muratore E, Biagi E, Prete A, et al. Insights into the role of intestinal microbiota in hematopoietic stem-cell transplantation. *Therapeutic advances in hematology*. 2020;11:2040620719896961.
117. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000713.
118. Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(4):682-700.
119. Krüger W, Vielreicher S, Kapitan M, Jacobsen ID, Niemiec MJ. Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2019;8(2):70.
120. Bongomin F, Otu A, Calisti G, Richardson MD, Barnard J, Venkateswaran R, et al. *Trichosporon japonicum* Fungemia and Ventricular Assist Device Infection in an Immunocompetent Patient. *Open forum infectious diseases*. 2019;6(9):ofz343.
121. el-Ebiary M, Torres A, Fabregas N, de la Bellacasa JP, Gonzalez J, Ramirez J, et al. Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients. An immediate postmortem histologic study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;156(2 Pt 1):583-90.
122. Biswas D, Agarwal S, Sindhvani G, Rawat J. Fungal colonization in patients with chronic respiratory diseases from Himalayan region of India. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2010;9:28.
123. Ruan SY, Chien JY, Hsueh PR. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49(1):e11-7.
124. Kohler P, Cornely OA, Vehreschild JJ. [Fungal infections]. *Der Internist*. 2019;60(7):684-9.
125. Eggimann P, Pittet D. *Candida* colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive Care Med*. 2014;40(10):1429-48.
126. Go SE, Lee KJ, Kim Y, Choi JK, Kim YJ, Lee DG. Catheter-Related *Trichosporon asahii* Bloodstream Infection in a Neutropenic Patient with Myelodysplastic Syndrome. *Infection & chemotherapy*. 2018;50(2):138-43.
127. Kato H, Yoshimura Y, Suido Y, Shimizu H, Ide K, Sugiyama Y, et al. Mortality and risk factor analysis for *Candida* blood stream infection: A multicenter study. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2019;25(5):341-5.
128. Kobayashi GS. *Disease Mechanisms of Fungi*. *Medical Microbiology 4th edition*. 1996;Chapter 74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8103/>.
129. Cramer R, Blaser K. Allergy and immunity to fungal infections and colonization. *The European respiratory journal*. 2002;19(1):151-7.
130. White PL, Barnes RA, Springer J, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Morton CO, et al. Clinical Performance of *Aspergillus* PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European *Aspergillus* PCR Initiative. *J Clin Microbiol*. 2015;53(9):2832-7.
131. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54 Suppl 1:S35-43.
132. Reid G, Lynch JP, 3rd, Fishbein MC, Clark NM. Mucormycosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2020;41(1):99-114.
133. Skiada A, Lass-Floerl C, Klimko N, Ibrahim A, Roilides E, Petrikos G. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Medical mycology*. 2018;56(suppl_1):93-101.
134. Springer J, Lackner M, Ensinger C, Risslegger B, Morton CO, Nachbaur D, et al. Clinical evaluation of a Mucorales-specific real-time PCR assay in tissue and serum samples. *Journal of medical microbiology*. 2016;65(12):1414-21.
135. Springer J, Goldenberger D, Schmidt F, Weisser M, Wehrle-Wieland E, Einsele H, et al. Development and application of two independent real-time PCR assays to detect clinically relevant Mucorales species. *Journal of medical microbiology*. 2016;65(3):227-34.

136. Caceres DH, Chiller T, Lindsley MD. Immunodiagnostic Assays for the Investigation of Fungal Outbreaks. *Mycopathologia*. 2020;185(5):867-80.
137. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latgé JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 1995;33(2):497-500.
138. Duettmann W, Koidl C, Krause R, Lackner G, Woelfler A, Hoenigl M. Specificity of mannan antigen and anti-mannan antibody screening in patients with haematological malignancies at risk for fungal infection. *Mycoses*. 2016;59(6):374-8.
139. Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 2015;78:49-54.
140. Drain PK, Hong T, Krows M, Govere S, Thulare H, Wallis CL, et al. Validation of clinic-based cryptococcal antigen lateral flow assay screening in HIV-infected adults in South Africa. *Scientific reports*. 2019;9(1):2687-.
141. Dizon E, Seo W, Butler-Wu SM, She RC. Clinical Significance of Low Serum Cryptococcal Antigen Titers by Lateral Flow Assay in Immunocompromised Patients: a Retrospective Case-Control Study. *J Clin Microbiol*. 2020;58(2).
142. Dynowska M, Góralska K, editors. *Saccharomyces cerevisiae in the respiratory system, digestive system and on the skin in humans*2006.
143. VadkertiováRenáta, MolnárováJana, VránováDana, SlávikováElena. Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Canadian Journal of Microbiology*. 2012;58(12):1344-52.
144. Asyikeen N, Ma, Aruf A, Ayob M, Wan Mustapha W. A new source of *Saccharomyces cerevisiae* as a leavening agent in bread making. *International Food Research Journal*. 2013;20:967-73.
145. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. 2003;102(3):827-33.
146. Dvorak CC, Steinbach WJ, Brown JM, Agarwal R. Risks and outcomes of invasive fungal infections in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2005;36(7):621-9.
147. Zhang Y, Liu C, Liu QF, Sun J, Fan ZP, Xu D, et al. [The clinical characteristic and risk factors for the incidence of invasive fungal infection in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2009;89(40):2814-7.
148. Williams KM, Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best practice & research Clinical haematology*. 2008;21(3):579-96.
149. Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, et al. Fungal Infections in Recipients of Hematopoietic Stem Cell Transplants: Results of the SEIFEM B-2004 Study—Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(9):1161-70.
150. Ohst T, Kupsch C, Gräser Y. Detection of common dermatophytes in clinical specimens using a simple quantitative real-time TaqMan polymerase chain reaction assay. *The British journal of dermatology*. 2016;174(3):602-9.
151. Mirhendi H, Motamedi M, Makimura K, Satoh K. Development a diagnostic pan-dermatophyte TaqMan probe real-time PCR assay based on beta tubulin gene. *Mycoses*. 2016;59(8):520-7.
152. Koo SH, Teoh YL, Koh WL, Ochi H, Tan SK, Sim DMF, et al. Development and validation of a real-time multiplex PCR assay for the detection of dermatophytes and *Fusarium* spp. *Journal of medical microbiology*. 2019;68(11):1641-8.
153. Bašková L, Landlinger C, Preuner S, Lion T. The Pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. *Journal of medical microbiology*. 2007;56(Pt 9):1167-73.

154. Walsh TJ, Wissel MC, Grantham KJ, Petraitiene R, Petraitis V, Kasai M, 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):4150-7.
155. Foongladda S, Mongkol N, Petlum P, Chayakulkeeree M. Multi-probe real-time PCR identification of four common *Candida* species in blood culture broth. *Mycopathologia.* 2014;177(5-6):251-61.
156. Weber JK, Scharf S, Walther G, Flüh G, MacKenzie CR, Kondakci M, et al. Detection of invasive *Trichosporon asahii* in patient blood by a fungal PCR array. *Access Microbiology.* 2021;3(12).
157. de Almeida Júnior JN, Hennequin C. Invasive *Trichosporon* Infection: a Systematic Review on a Re-emerging Fungal Pathogen. *Frontiers in microbiology.* 2016;7:1629.
158. Liu Y-S, Wang N-C, Ye R-H, Kao W-Y. Disseminated *Fusarium* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia: A case report and review of the literature. *Oncology Letters.* 2014;7:334 - 6.
159. Bojarczuk A, Miller KA, Hotham R, Lewis A, Ogryzko NV, Kamuyango AA, et al. *Cryptococcus neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. *Scientific reports.* 2016;6:21489.
160. Sanguinetti M, Posteraro B, Beigelman-Aubry C, Lamoth F, Dunet V, Slavin MA, et al. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2019;74:ii2W ii37.
161. Lass-Flörl C, Mutschlechner W, Aigner M, Grif K, Marth C, Girschikofsky M, et al. Utility of PCR in diagnosis of invasive fungal infections: real-life data from a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):863-8.
162. Hage CA. Microbiological Laboratory Testing in the Diagnosis of Fungal Infections in Pulmonary and Critical Care Practice. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *2019;200(5):535-50.*

Anhang

7.1 Zusätzliche Tabellen

Tab. 23: Detektierte Pilze im respiratorischen Spülwasser

	Respiratorisches Spülwasser	Hämatologische Patienten (n=152)				Kontrollgruppe (n=41)			
		Kultur	Kultur & fuPCR-Assay	fuPCR-Assay	Σ	Kultur	Kultur & fuPCR-Assay	fuPCR-Assay	Σ
Schimmelpilze	<i>Aspergillus hiratsukae</i>	2			2				0
	<i>Aspergillus spp.</i>	1		5	6			1	1
	<i>Penicillium crustosum</i>	1			1				0
	<i>Penicillium spp.</i>	1		2	3				0
	<i>Cladosporium spp.</i>	1		1	2				0
	<i>Fusarium spp.</i>			5	5				0
Hefen	<i>Candida albicans</i>	20	43	11	74	4	2		6
	<i>Candida dubliniensis</i>		1	7	8		2		2
	<i>Candida glabrata</i>	26	2	2	30	2		1	3
	<i>Candida sake</i>			1	1				0
	<i>Candida spp.</i>	1			1	2			2
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			9	9			3	3
	<i>Cryptococcus spp.</i>			3	3				0
	<i>Trichosporon spp.</i>			13	13				0
	Σ	53	46	59	158	8	4	5	17

Tab. 24: Detektierte Pilze im Blut

		Hämatologische Patienten (n=152)					Kontrollgruppe (n=41)				
	Blood	Serum	Blut	Blut & Plasma	Plasma	Σ	Serum	Blut	Blut & Plasma	Plasma	Σ
Schimmelpilze	<i>Penicillium brevicompactum</i>		1			1					0
	<i>Penicillium spp.</i>		2			2					0
	<i>Alternaria spp.</i>	1				1		1			1
	<i>Cladosporium spp.</i>	1				1					0
	<i>Fusarium spp.</i>	2				2					0
Hefen	<i>Candida albicans</i>		1	4	3	8				1	1
	<i>Candida glabrata</i>	1				1					0
	<i>Candida boidinii</i>	1				1					0
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1				1					0
	<i>Cryptococcus spp.</i>	1	1			2					0
	<i>Trichosporon spp.</i>	2	3			5					0
	<i>Malassezia spp.</i>		1			1					0
	<i>Dioszegia spp.</i>	1				1					0
	Σ	11	9	4	3	27	0	1	0	1	2

7.2 Publikationen

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

Scharf S, Bartels A, Kondakci M, Pfeffer K, Henrich B, Haas R. *Introduction of a bead beating step improves fungal DNA extraction from selected patient specimens, International Journal of Medical Microbiology* 310 (2020) 151443; <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151443>

- Kultivierung von Pilzen für Spike-in Experimente
- Gewinnung von Respiratorischem Spülwasser und Blut gesunder Probanden
- Spiken von Puffer und Probenmaterialien mit Pilz-Suspensionen
- Durchführung verschiedener DNA-Extraktionsmethoden
- Quantitative und qualitative Erfassung der freigesetzten Pilz-DNA-Menge
 - Spektrophotometrische Messung
 - Durchführung der fuPCR
 - Vorbereitung von Fragmentlängenanalysen
- Statistische Auswertung der Daten und Erstellung von Grafiken
- Entwurf und Revision des Manuskripts

Scharf S, Bartels A, Kondakci M, Haas R, Pfeffer K, Henrich B. *fuPCR as diagnostic method for the detection of rare fungal pathogens, such as Trichosporon, Cryptococcus and Fusarium, Medical Mycology*, 2021; myab045, <https://doi.org/10.1093/mmy/myab045>

- Vorbereitung eingehender Studienproben
 - Präparation der Plasma-Proben
- Kultivierung von Pilzen aus den klinischen Materialien
- Serologische Analyse der Blutproben
- Extraktion fungaler DNA aus den klinischen Materialien
- Durchführung der fuPCR zur Detektion von Pilz-DNA

- Auswertung der PCR-Daten und Vorbereitung der Proben für Sanger-Sequenzierung
- Durchführung von BLAST-Analysen und Identifizierung der Pilzspezies
- Statistische Auswertung der Daten und Erstellung von Grafiken
- Entwurf und Revision des Manuskripts

Weber J, **Scharf S**, Walther G, Flüh G, MacKenzie C, Kondacki M, Henrich B, Kohns Vasconcelos M. *Detecion of invasive Trichosporon asahii in patient blood by a fungal PCR array*, *Access Microbiology*, 2021; <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000285>

- Durchführung der fuPCR zur Detektion von Pilz-DNA
- Auswertung der PCR-Daten und Vorbereitung der Proben für Sanger-Sequenzierung
- Durchführung von BLAST-Analysen und Identifizierung der Pilzspezies
- Erstellung von Abbildungen
- Revision des Manuskripts

7.3 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Haas, der mir die Chance eröffnet hat, in diesem interessanten Themenfeld promovieren zu können. Die Zusammenarbeit mit ihm und der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie habe ich stets als konstruktiv und motivierend erlebt.

Ein herzliches Dankeschön geht außerdem an Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer, für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anfertigen zu dürfen.

Frau Prof. Dr. Birgit Henrich möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Sie betreute mich durch meine ganze Promotionszeit stets außerordentlich fördernd und unterstützte mich geduldig mit hilfreichen Ratschlägen und enormen Wissen.

Herrn Prof. Dr. Rainer Kalscheuer danke ich vielmals für die Übernahme des Koreferats seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Für die finanzielle Unterstützung in Form meines Stipendiums danke ich der Jürgen Manchot Stiftung.

Ein großer Dank geht ebenfalls an Frau Dr. Anna Bartels und Herrn Dr. Mustafa Kondakci für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und der Probennahme im Rahmen der klinischen Studie.

Frau Dana Belick, Herrn Robin Biermann, Herrn Lars Vogelgsang und Frau Laura Röhling danke ich herzlich für ihre Hilfe bei Experimenten und ihre Unterstützung im Laboralltag.

Ein herzliches Dankeschön gilt zudem Frau Meike Rosenblatt und Frau Christin Hoop für die ständige Hilfsbereitschaft bei diagnostischen Fragestellungen.

Frau Dr. Nicole Neuhausen danke ich für ihre informativen Ratschläge und Informationen über Pilz-Pathogene.

Bei Herrn Dr. Malte Kohns Vasconcelos bedanke ich mich für die Beratung und Hilfe bei statistischen Auswertungen.

Ein weiterer großer Dank geht an Herrn Dr. Tobias Wienemann für die Unterstützung bei der Probenakquise von gesunden Probanden.

Frau Anja Schuster und Herrn Thorsten Wachtmeister danke ich für die Durchführung von Sanger-Sequenzierungen und Fragmentlängenanalysen.

Mein Dank gilt ebenso allen nicht namentlich genannten Kolleginnen, Kollegen Freundinnen und Freunden. Jede einzelne Person hat dazu beigetragen, dass meine Promotionszeit für mich eine der besten Erfahrungen meines Lebens war.

Ein außerordentlicher Dank geht zudem an meine Eltern, die mich stets in größtem Maße unterstützt und ermutigt haben.

7.4 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die hier vorliegende Dissertation „Prospektive Studie zur klinischen Wertigkeit einer Multiplex PCR (fuPCR) für die Detektion von invasiven Mykosen bei immunsupprimierten Patienten“ 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

(Sebastian Alexander Scharf)