

**Aus der Klinik und Poliklinik für innere Medizin II  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele**

**Etablierung und Evaluierung einer Extraktionskontrolle für den Nachweis von  
*Aspergillus fumigatus*-DNA aus Humanserum.**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Andreas Rauer**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Mai 2019**

**Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler**

**Koreferent: Prof. Dr. med. Oliver Kurzai**

**Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2020**

**Der Promovent ist Arzt**

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	1
1.2 Einfluss von <i>Aspergillus fumigatus</i> auf den Menschen .....	2
1.3 Die Pathophysiologie der <i>Aspergillus fumigatus</i> Infektion .....	3
1.4 Möglichkeiten zur Diagnosestellung invasiver Aspergillose .....	4
1.4.1 Etablierte diagnostische Möglichkeiten.....	4
1.4.2 Bisherige Arbeiten zur Evaluation der PCR-Diagnostik der invasiven Aspergillose .....	5
1.5 Prognose der invasiven Aspergillose und aktuelle Studienlage zum Outcome .....	7
1.6 Ziele der Arbeit .....	9
2. Material und Methoden .....	10
2.1 Geräte und Materialien .....	10
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	10
2.1.2 Kits.....	12
2.1.3 Geräte.....	13
2.1.4 Software.....	15
2.1.5 Verwendete <i>Bacillus subtilis</i> Primer und Sonde für den Mastermix.....	16
2.1.6 Verwendete <i>Aspergillus fumigatus</i> Primer und Sonden für den Mastermix .....	16
2.2 Methoden .....	16
2.2.1 Bakterien und Pilze.....	16
2.2.1.1 Gewinnung der <i>Bacillus subtilis</i> -DNA .....	16
2.2.1.2 Bezug der <i>Aspergillus fumigatus</i> -DNA.....	17
2.2.2 Serumproben.....	18
2.2.2.1 Blutentnahme und Gewinnung von Serumproben .....	18

2.2.2.2 Einbringen der DNA von <i>Aspergillus fumigatus</i> und <i>Bacillus subtilis</i> in Serumproben .....	18
2.2.2.3 Extraktion der <i>Aspergillus fumigatus</i> und <i>Bacillus subtilis</i> -DNA aus Humanserum .....	20
2.2.3 PCR.....	21
2.2.3.1 Zusammensetzung des optimierten Mastermixes für den Nachweis von <i>Bacillus subtilis</i> -DNA in der Real-Time PCR .....	21
2.2.3.2 Real-Time PCR .....	25
2.2.4 Aufbereitung der Proben für die Real-Time PCR und Umgebungsbedingungen .....	25
2.2.4.1 Anlegen der Verdünnungsreihen mit <i>Bacillus subtilis</i> - und <i>Aspergillus fumigatus</i> -DNA .....	25
2.2.4.2 Umgebungsbedingungen, in denen der Mastermix für die Real-Time PCR erstellt wurde .....	25
2.2.4.3 Umgebungsbedingungen, in denen die Proben für die Real-Time PCR pipettiert wurden .....	26
2.2.4.4 PCR-Protokoll .....	26
3. Ergebnisse.....	28
3.1 Versuche zur Optimierung des Mastermixes .....	29
3.1.1 Versuche mit Verdünnungsreihen von <i>Bacillus subtilis</i> Primer und Sonden .....	29
3.1.2 Testung des Mastermixes für Real-Time PCR im Duplexformat .....	34
3.2 Einfluss verschiedener Elutionsvolumina auf die extrahierte DNA-Gesamtmenge .....	37
3.3 Testung extrahierter Proben (Humanserum mit <i>Aspergillus fumigatus</i> -DNA und <i>Bacillus subtilis</i> -DNA) im Monoplexformat .....	38
3.3.1 Testung eines zweiten Eluates derselben Humanserumprobe .....	39

3.3.1.1 Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von <i>Aspergillus fumigatus</i> -DNA .....	41
3.3.1.2 Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung von Humanserumproben mit <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	43
3.3.1.3 Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von <i>Bacillus subtilis</i> -DNA .....	46
3.3.1.4 Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung von Humanserumproben mit <i>Bacillus subtilis</i> .....	49
3.3.2 Vergleich der Ergebnisse von GEX-Mastermix und Sso-Mastermix in der Real-Time PCR.....	50
3.3.2.1 Vergleich zwischen GEX-Mastermix und Sso-Mastermix für <i>Aspergillus fumigatus</i> im Monoplexformat in wässriger Lösung .....	51
3.3.2.2 Vergleich zwischen GEX-Mastermix und Sso-Mastermix für <i>Bacillus subtilis</i> im Monoplexformat in wässriger Lösung .....	52
3.3.2.3 Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von <i>Aspergillus fumigatus</i> und Vergleich der Ergebnisse mit Sso- und GEX-Mastermix .....	54
3.3.2.4 Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von <i>Bacillus subtilis</i> und Vergleich der Ergebnisse im Sso- und GEX-Mastermix.....	55
3.3.3 Extraktionseffizienz und Vergleich der Eluate im Monoplexformat mit Sso-Mastermix.....	57
3.3.3.1 Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung von Humanserumproben mit <i>Aspergillus fumigatus</i> mit Sso-Mastermix .....	58
3.3.3.2 Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung von Humanserumproben mit <i>Bacillus subtilis</i> mit Sso-Mastermix .....	59
3.4 Versuche im Duplexformat.....	61
3.4.1 Vergleich von Experimenten im Monoplex- versus Duplexformat mit Sso-Mastermix.....	61

3.4.1.1	Unterschied der Cq-Werte von <i>Aspergillus fumigatus</i> im Monoplex- zu Duplexformat mit Sso-Mastermix ohne <i>Bacillus subtilis</i> -DNA .....	62
3.4.1.2	Auswirkung auf die Cq-Werte von <i>Aspergillus fumigatus</i> -DNA bei eingebrachter <i>Bacillus subtilis</i> -DNA im Sso-Mastermix.....	62
3.4.2	Vergleich von Experimenten im Monoplex- versus Duplexformat mit GEX-Mastermix.....	66
3.4.2.1	Unterschied der Cq-Werte von <i>Aspergillus fumigatus</i> im Monoplex- zu Duplexformat mit GEX-Mastermix ohne <i>Bacillus subtilis</i> -DNA.....	66
3.4.2.2	Auswirkung auf die Cq-Werte von <i>Aspergillus fumigatus</i> -DNA bei eingebrachter <i>Bacillus subtilis</i> -DNA im GEX-Mastermix .....	67
3.4.3	Vergleich der Cq-Werte zwischen Sso- und neuen Chargen von GEX-Mastermix.....	70
3.4.4	Einfluss von <i>Aspergillus fumigatus</i> -DNA auf die Cq-Werte von <i>Bacillus subtilis</i> .....	71
4.	Diskussion .....	74
4.1	Optimierung des Mastermixes .....	75
4.2	Ermittlung des idealen Elutionsvolumens .....	76
4.3	Versuche im Monoplexformat .....	77
4.3.1	Probleme der DNA-Aufbereitung .....	77
4.3.2	Kontamination bei der DNA-Aufbereitung.....	81
4.3.3	Vergleich verschiedener Blutkompartimente in der PCR .....	82
4.3.4	Die Serum-PCR im Vergleich und in Kombination mit anderen diagnostischen Verfahren bei der invasiven Aspergillose.....	84
4.4	Versuche im Duplexformat.....	86
5.	Zusammenfassung .....	90
6.	Literaturverzeichnis, Abbildungsverzeichnis, Tabellenverzeichnis .....	92
6.1	Literaturverzeichnis .....	92

6.2 Abbildungsverzeichnis.....	97
6.3 Tabellenverzeichnis .....	99
Danksagung .....	1
Lebenslauf .....	2
Persönliche Daten .....	2
Schulbildung.....	2
Studium.....	3
Beruflicher Werdegang.....	3

# 1. Einleitung

## 1.1 *Aspergillus fumigatus*

*Aspergillus fumigatus* gehört zur Gattung der Schlauchpilze (Ascomycota). Sein Name leitet sich aus *Aspergillus*, der Gießkannenschimmel, und *fumigatus*, die rauchgrüne Farbe der Sporen, ab (lat. fumus = Rauch). Die Farbe der Sporen kommt durch das Pigment 1,8-Dihydroxynaphthalin-Melanin zustande. *Aspergillus fumigatus* ernährt sich hauptsächlich von sich zersetzenden und abgestorbenen organischen Substanzen und spielt eine entscheidende Rolle in der Verwertung von Kohlenstoff und Stickstoff. Aus diesem Grund wird er auch zu den Saprobionten (griechisch sapos = faul, verfault) gezählt[1, 2]. *Aspergillus fumigatus* wächst bei einer Temperatur von 12 bis 56 °C [1, 3]. Pilze der Gattung *Aspergillus* sind weltweit verbreitete Schimmelpilze, die in über 200 verschiedenen Arten vorkommen. Ein typisches mikromorphologisches Merkmal sind die in einer Vesicula (Blase) endenden Konidienträger. Die sehr stark ausgeprägte Sporenbildung ist der Grund für das allgegenwärtige Vorkommen. In einem Kubikmeter Luft können sowohl in geschlossenen Räumen als auch im Freien bis zu einhundert Sporen entdeckt werden[2].

Es gibt nur wenige *Aspergillus* Arten, die eine klinische Bedeutung für den Menschen haben. Die meisten Infektionen des Menschen werden hauptsächlich durch *Aspergillus fumigatus* verursacht. Seltener sind *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans* oder *Aspergillus versicolor* für eine Infektion verantwortlich [4].

Zunächst wurde *Aspergillus fumigatus* eine rein asexuelle Fortpflanzung unterstellt. In einer Genanalyse des *Aspergillus*-Genoms wurden dann zwei Gene nachgewiesen, die auch für die sexuelle Vermehrung bei anderen filamentösen Pilzen wichtig sind. Die Tatsache, dass sich *Aspergillus fumigatus* auch sexuell fortpflanzen kann[3, 5], stellt eine



große Herausforderung an die antimykotische Therapie dar. Durch die sexuelle Vermehrung kommt es zu einer größeren Genvielfalt. Dadurch können sich *Aspergillus fumigatus* und andere *Aspergillusarten* leichter an veränderte Umwelteinflüsse evolutionär anpassen und auch leichter Resistenzen gegen die gängigen Antimykotika entwickeln [6, 7].

## 1.2 Einfluss von *Aspergillus fumigatus* auf den Menschen

Der Mensch ist ständig mit *Aspergillus fumigatus*-Sporen über die Haut und Schleimhaut in Kontakt. Die Sporen werden eingeatmet und gelangen angesichts ihrer geringen Größe von nur 1-3 µm Durchmesser bis in die Alveolen der Lunge [8]. Sie werden vom gesunden Menschen meist problemlos aus den Alveolen eliminiert. Bei entsprechend großen Mengen von *Aspergillus fumigatus*-Sporen können diese aber allergische Reaktionen hervorrufen [2, 4, 9].

Risikofaktoren für eine Infektion mit *Aspergillus fumigatus* sind zum Beispiel HIV Infektion, maligne Bluterkrankungen, Neutropenie, Kortisontherapie, Diabetes mellitus, Mukoviszidose, Chemotherapie bei einer Krebserkrankung, Zustand nach Organtransplantationen, Lungengewebeschäden oder angeborene und erworbene Immundefekte. Bei diesen Menschen stellt eine Infektion mit *Aspergillus fumigatus* ein ernsthaftes medizinisches Problem dar [4, 10, 11]. In den letzten Jahrzehnten erlangen fulminante Erkrankungen durch *Aspergillus fumigatus* immer mehr Bedeutung. Der Grund ist die deutlich Zunahme an Transplantationen und Behandlungen beispielsweise von hämatoonkologischen Erkrankungen, die aber ihrerseits eine Immunsuppression des Patienten erfordern [1].

### 1.3 Die Pathophysiologie der *Aspergillus fumigatus* Infektion

Die meisten Infektionen mit *Aspergillus fumigatus* werden durch das Einatmen von diesen Sporen verursacht. Falls die eingeatmeten Sporen in den Alveolen nicht von der Immunabwehr, den alveolären Makrophagen oder von den neutrophilen Granulozyten phagozytiert oder vernichtet werden, keimen diese aus. Sie bilden ein Myzel, das sich zunächst in den Alveolen verzweigt und so die Lunge befällt. Die Pathogenität kommt durch die vom Pilz produzierten Proteine und Toxine zustande. Die Proteine fördern das Wachstum von *Aspergillus fumigatus* in der Lunge und die Toxine schädigen die Alveolarepithelzellen, die sogenannten Pneumozyten, und verhindern so die Produktion wichtiger Enzyme und anderer wichtiger Stoffe, wie z. B. des Surfactant in der Lunge. Letztendlich kommt es zur Zerstörung der Alveolarepithelzellen. Falls die Immunabwehr diesen Prozess nicht frühzeitig erkennen oder unterbrechen kann, ist es möglich, dass sich der Pilz über die Blutgefäße im ganzen Körper ausbreitet und andere Organe, wie zum Beispiel Gehirn und/oder Herz, befällt. Diese Stufe der Infektion wird dann als invasive Aspergillose bezeichnet. 90 % der invasiven Aspergillosen werden durch *Aspergillus fumigatus* verursacht [1, 2, 8].

Die Sporen von *Aspergillus fumigatus* können aber auch schon vorhandene Körperhöhlen befallen, wie sie zum Beispiel durch Tuberkulose entstehen können. In diesem Fall spricht man von einem Aspergillom [2]. Asthma bronchiale, allergische Alveolitis und chronische Lungenschäden werden durch stark mit Pilzsporen kontaminierte Gegenstände und Luft, wie zum Beispiel bei der Verarbeitung von Getreide oder Heu, begünstigt. Man spricht hier von einer sog. Farmerlunge. Bei chronisch verlaufender Schimmelpilzallergie ist aufgrund einer möglichen IgE-Kreuzreaktivität mit humanen Proteinen eine autoimmune Komponente bei der Entstehung einer Allergie denkbar. Speziell bei Patienten, die an einer Mukoviszidose leiden, kann eine solche Reaktion den Gasaustausch in der Lunge stark behindern [4].

## 1.4 Möglichkeiten zur Diagnosestellung invasiver Aspergillose

Eine frühzeitige Erkennung und die sichere Diagnose der invasiven Aspergillose ist für die Prognose und das „Outcome“ des Patienten von essentieller Bedeutung [12-14]. Mit den bisherigen konventionellen Methoden und Tests ist dies bis heute sehr schwierig. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von molekularen und serologischen Verfahren entwickelt und getestet, um so die invasive Aspergillose schneller nachzuweisen oder zu bestätigen [15, 16]. Die *European Organisation for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group* und das *National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group* kurz (EORTC/MSG) haben verschiedene klinische Kriterien und Diagnosemethoden zusammengetragen. Durch die von der EORTC/MSG erstellten Leitlinien können neue Therapiestrategien entwickelt, diagnostische Verfahren validiert und zahlreiche epidemiologische Studien erstellt werden. Die EORTC/MSG unterscheiden drei Kategorien: „Sichere, mögliche und wahrscheinliche invasive Pilzkrankung“. Je nach Patient können dann die entsprechenden diagnostischen Verfahren und Tests angewandt werden, um die Diagnose zu sichern und eine entsprechende Therapie zu beginnen [17].

### 1.4.1 Etablierte diagnostische Möglichkeiten

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um *Aspergillus fumigatus* Infektionen zu diagnostizieren. Nach der EORTC/MSG kann bei den „sicheren invasiven Pilzkrankungen“ eine mikroskopische Analyse von Lungengewebe oder die zytologische Untersuchung von Material aus einer bronchoalveolären Lavage durchgeführt werden. Mikroskopisch können z. B. typische Pilzformen oder typische Gewebeschädigungen erkannt werden. Das Anlegen einer Pilzkultur aus Kiefernebenhöhlensekret ist ebenfalls eine Möglichkeit, um die Diagnose zu sichern. Das Anlegen einer Pilzkultur aus steril abgenommenem Blut ist möglich, jedoch ist sie sehr häufig negativ, trotz des sicheren Nachweises einer invasiven Aspergillose mit anderen Testverfahren. De Pauw et al. schreiben in ihrer Publikation

„Die Gewinnung von *Aspergillus*-Arten aus Blutkulturen bedeutet stets eine Kontamination“ [17]. Bei den „möglichen invasiven Pilzkrankungen“ wird der Nachweis durch CT-, MRT- und Röntgenuntersuchung zur Diagnosefindung herangezogen. Auch die endoskopische Untersuchung der Kiefer- und Nasennebenhöhlen und die Bronchoskopie mit Entnahme von Gewebematerial und Untersuchung der bronchoalveolären Lavage werden empfohlen. Als indirekte Tests stehen hier noch der Galaktomannan-ELISA-Test und die 1-3- $\beta$ -D-Glucan-Bestimmung ergänzend zur Verfügung [17]. Die indirekten Testverfahren können leicht beeinflusst und verfälscht werden. Beispielsweise haben Patienten, die an einer Neutropenie leiden oder bereits mit antibiotischen oder antimykotischen Medikamenten behandelt werden, sehr häufig falschpositive Testergebnisse [18]. Speziell bei der 1-3- $\beta$ -D-Glucanbestimmung kann keine Spezifität für *Aspergillus fumigatus* garantiert werden, da 1-3- $\beta$ -D-Glucan auch in vielen anderen Zellwänden verschiedener Pilzarten vorkommt [19]. Nicht inbegriffen in die Kriterien der EORTC/MSG ist die Detektion von *Aspergillus fumigatus*-DNA mittels PCR aus Blut oder Serum. Der Grund dafür ist, dass es bis heute kein standardisiertes Verfahren für diese Methode gibt [15].

#### 1.4.2 Bisherige Arbeiten zur Evaluation der PCR-Diagnostik der invasiven Aspergillose

Es gibt, wie bereits erwähnt, kein standardisiertes Verfahren zur *Aspergillus fumigatus* Detektion mittels PCR. Es gibt aber zahlreiche Publikationen und Studien, die sich mit der Standardisierung oder mit der Kombination der Real-Time PCR mit anderen schon etablierten Testverfahren befassen. In einer Publikation von S. Imbert et al. wurde Galaktomannan Assay und PCR kombiniert und verglichen. Es wurden 5146 Serumproben von 941 Patienten getestet. Die Serum-PCR hatte eine Sensitivität von 67,7 %, eine Spezifität von 98,7 % und einen positiven Vorhersagewert von 75,6 %. Der Galaktomannan Assay hatte zum Vergleich eine Sensitivität von 78,4 %, eine Spezifität von 87,5 %, einen positiven Vorhersagewert von 27 % und einen negativen Vorhersagewert von 98,6%. Bei der Kombination von Galaktomannan Assay und Serum-PCR konnte die Sensitivität auf 88,2 % gesteigert werden [15]. Marios Arvanitis et al. analysierten 25 Studien mit

insgesamt 2595 Patienten. Es wurde die Performens von Vollblut- und Serum-PCRs evaluiert und mit einander verglichen. Die Sensitivität war nach der Analyse der Studien zwischen 76 % und 84 %. Einen signifikanten Unterschied zwischen Vollblut- und Serumextraktion konnte nicht bewiesen werden. Allein ein positives oder ein negatives Testergebnis kann nach dieser Analyse eine Infektion mit *Aspergillus fumigatus* nachweisen oder ausschließen. Werden jedoch zwei positive Proben erzielt, steigert dies die Spezifität auf 95 % und die Sensitivität auf 64 %. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zwei positive PCR-Ergebnisse als starker Hinweis auf eine aktive *Aspergillus fumigatus* Infektion schließen lässt [20]. C. Mengoli et al. haben in ihrer Studie eine systematische Überprüfung und Metanalyse von der PCR-Diagnostik der invasiven Aspergillose durchgeführt. Hierzu haben sie 16 Studien analysiert mit Daten von mehr als 10000 Blut-, Serum- und Plasmaproben von 1618 Patienten. Die Odds-Ratios bei sicherer und möglicher invasiver Aspergillose waren ähnlich. Bei zwei aufeinander folgenden positiven PCR-Ergebnissen war die Odds-Ratio bei 15,97 (95% CI 6,83-37,34) bei einer positiven PCR-Probe war die Odds-Ratio bei 16,41 (95% CI 6,43-41,88). Die Sensitivität und Spezifität der PCR für zwei aufeinander folgende positive Proben war bei einem Wert von 0,75 (95% CI 0,54-0,88) und 0,87 (95% CI 0,78-0,93). Bei einer einzelnen positiven Probe war die Sensitivität bei einem Wert von 0,88 (95% CI 0,04-0,88) und die Spezifität bei einem Wert von 0,75 (95% CI 0,63-0,84). Während die Spezifität bei den einzelnen positiven Proben denen von zwei aufeinander folgenden positiven Proben signifikant überlegen ( $p=0,027$ ) war, unterschieden sich die Sensitivität und die Odds-Ratio von einzelnen positiven Proben zu zwei aufeinander folgenden positiven Proben nicht signifikant. Abschließend kann gesagt werden, dass eine einzelne negative Probe ausreichend ist, um eine „sichere“ oder „wahrscheinliche“ invasive Aspergillose auszuschließen. Es sind jedoch zwei aufeinander folgende positive Proben notwendig, um die Diagnose „invasive Aspergillose“ zu bestätigen. Problem bei dieser Studie ist die Inhomogenität der verwendeten PCR-Methoden bei den analysierten Studien und die unterschiedlich erkrankten Patienten [21]. Eine weitere Studie von Aguado et al., die an 13 spanischen Kliniken durchgeführt wurde, sollte den Nutzen einer Kombination des Serum-Galaktomannan-Assay und mit der Serum-Real-Time-PCR evaluieren. Es wurden 219 Patienten untersucht und verglichen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass den Patienten, die mit

Galaktomannan-Assay und Real-Time-PCR getestet wurden, schon am 13. Tag statt am 20. Tag, wie in der Galaktomannan-Gruppe eine Diagnose gestellt werden konnte. Der Einsatz von einer empirischen antimykotischen Therapie konnte auf 16,7 % gesenkt werden gegenüber 29,0 % ( $P=0,038$ ) der Galaktomannan-Gruppe. Durch die gezielte und schnellere Therapie hatten die Patienten in der Galaktomannan-PCR-Gruppe eine höhere Überlebenschance ( $P=0,027$ ) [22]. Stephen A. Bustin et al. haben in ihrer Publikation „*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE)*“ auf die mangelnden experimentellen Details hingewiesen, die es für den Leser teilweise unmöglich machen, die diversen Testergebnisse in den publizierten Studien valide zu vergleichen. Laut Bustin ist auch das der Grund, warum bisher kein Konsens über die Performens und Interpretation der quantitativen Real-Time PCR in der *Aspergillus*-Diagnostik existiert. In dieser Publikation ist eine Checkliste enthalten, die in einer Veröffentlichung zur Real-Time-PCR enthalten sein müsste. Z.B. sollten alle Reagenzien, Sequenzen, PCR-Protokolle und Analysemethoden verständlich dargestellt werden [23].

### 1.5 Prognose der invasiven Aspergillose und aktuelle Studienlage zum Outcome

Die Prognose bei einer invasiven Aspergillose ist bis zum heutigen Tage sehr schlecht. Dies kann durch verschiedene klinische Studien belegt werden. Das mikrobiologische Institut der Universität Essen und Duisburg hat zum Beispiel in einer retrospektiven Studie 38 Patienten untersucht, die nach den Kriterien der EORTC/MSG an einer „möglichen“ oder „sicheren“ invasiven Aspergillose erkrankt waren. Die Patienten wurden mit einem SeptiFast-Assay getestet. 25 der 38 Patienten wurden mit einem SeptiFast-Assay positiv getestet. 23 der positiv getesteten Patienten starben innerhalb der ersten 30 Tage trotz Voriconazol-Therapie. Dies bedeutet eine Mortalität von 92 % in dieser Studie. Bei den 13 Patienten, die negativ getestet wurden, bekamen 7 eine antimykotische Behandlung vor und auch während der Blutentnahmen. 6 von ihnen überlebten 30 Tage, 7 von ihnen verstarben in den ersten 30 Tagen [24].

In einer anderen Arbeit der Pariser Sorbonne Universität wurden in einer retrospektiven Studie von 2012-2014 alle Patienten, die ein erhöhtes Risiko hatten, an einer invasiven Aspergillose zu erkranken, routinemäßig mit einem Galaktomannan Serologie Assay und einer *Aspergillus fumigatus*-PCR getestet und verglichen. Es wurden insgesamt 976 Patienten untersucht, bei 941 standen klinische Daten zu Verfügung. 51 Patienten waren demnach „sicher“ oder „möglich“ an einer invasiven Aspergillose erkrankt. 21 Patienten hatten eine maligne Bluterkrankung und 8 von ihnen bekamen eine Stammzelltransplantation, 14 hatten solide Organe transplantiert bekommen und 5 hatten andere Risikofaktoren für eine invasive Aspergillose. Nach 3 Monaten waren noch 51 % der 51 Patienten am Leben. Die Patienten, die an einer Neutropenie von  $<500/\mu\text{l}$  litten, hatten eine Mortalität von 54,5 %, Patienten ohne Neutropenie hatten eine Mortalität von 44,8 % [15].

## 1.6 Ziele der Arbeit

Für Patienten, die ein hohes Risiko haben, eine invasive Aspergillose zu erleiden, ist es essenziell, frühzeitig eine antimykotische Behandlung zu erhalten. Diese kann nur nach einer routinemäßigen und effizienten Diagnostik erfolgen.

Ziele dieser Arbeit sind:

1. Die Modifizierung der Mastermix-Zusammensetzung für die Detektion von *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* für Humanserum zur routinemäßigen und standardisierten Verwendung.
2. Die Ermittlung des idealen Elutionsvolumens nach DNA-Aufbereitung.
3. Die Evaluation der Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung.
4. Etablierung einer Extraktionskontrolle mittels eines *Bacillus subtilis*-DNA-Nachweises in jeder Probe.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>		<b>Firma</b>
Sso Fast Probes Supermix		Bio-Rad Laboratories GmbH, (München, D)
<i>Bacillus subtilis</i> Primer	16S S 20 µM 16S A 20 µM	TIB MOLBIOL, (Berlin, D)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Primer	AspF/P1 50 µM Fung5,8/P2 50 µM	TIB MOLBIOL, (Berlin, D)
<i>Bacillus subtilis</i> Sonde	BHQ 24 µM	TIB MOLBIOL, (Berlin, D)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Sonde	PFITS BHQ 24 µM	TIB MOLBIOL, (Berlin, D)
GEX- MIX	GenEX master mix	Applied Biosystems
PCR Wasser		Roche, (Basel, CH)
Eppendorfer-Gefäße	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Star LAB, SARSTEDT (Nümbrecht, D)

Multiphy- $\mu$ Strip Pro 8- Strip low profile	8ter Streifen für StepOnePlus	SARSTEDT, (Nümbrecht, D)
Falcon	15 ml, 50 ml	Greiner, (Kremsmünster, A)
Pipetten	Bio-one Cellstar	Greiner, (Kremsmünster, A)
96 Fast PCR- Platte	Halbrand	SARSTEDT, (Nümbrecht, D)

### 2.1.2 Kits

<b>Inhalt</b>	<b>KIT</b>	<b>Firma</b>
QIAamp Spin Columns	QIAamp UltraSens Vi-	QIAGEN Sample & As-
Collection tubes (2ml) Puffer	rus Kit	say Technologies, (Hil-
AC		den, D)
Puffer AR		
Puffer AB		
Puffer AW1		
Puffer AW2		
Puffer AVE		
Proteinase K		
Carrier RNA		

### 2.1.3 Geräte

<b>Gerät</b>		<b>Firma</b>
Pipetten	Volumen 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, (Hamburg, D)
Zentrifuge I	Galaxy Mini Centrifuge	VWR International, (Randor, USA)
Zentrifuge II	MC- 6400- Centrifuge	A. Hartenstein (Würzburg, D)
Zentrifuge III	Multifuge 3S-R	Therma Scientific, Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge IV	Centrifuge 5415 D	Eppendorf, (Hamburg, D)
Vortex	VortexGenie 2	Scientific Industries, (New York, USA)
Mixing Block	MB- 102	BioER, (Hangzhou, CHN)
PCR- System I	LightCycler 1,5 Caru- sel- Based System	Roche Diagnostics, (Mannheim, D)
PCR- System II	StepOnePlus™ Real- Time PCR System	Life Technologies, Applied Biosystems, (Foster City, USA)

Kühlschränke und Gefrierschränke		Liebherr (Ulm, D), Heraeus (Hanau, D)
Class 2 laminar flow Kabine	Type A2 Biosafety Cabinet	Germfree, (Ormond Beach, USA)
StepOnePlus		Applied Biosystems (Foster City, USA)
Wasserbad Memmert WB7		Memmert (Nürnberg/Heilbronn, D)
Zeitschaltuhr		Theben (Haigerloch, D)

#### 2.1.4 Software

Origin 8 (2017)	MicroCal Inc., (Northampton, Massachusetts, USA)
Word (2010, 2016)	Microsoft, (Redmond, USA)
Exel (2010,2016)	Microsoft, (Redmond, USA)
StepOne Software version 2.1 (2009)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
LightCycler Software version 3 (1999)	Roche Applied Science (Penzberg, D)

### 2.1.5 Verwendete *Bacillus subtilis* Primer und Sonde für den Mastermix

Der Primer für *Bacillus subtilis* 16 S-S hatte den Basencode 5`-ggTCTTgACATCCT-gACAATCCTA-3` und Primer *Bacillus subtilis* 16 S-A den Basen-code 5`-AACTgAAT-gCTggCAACTAAgATCA-3`.

Die Sonde für *Bacillus subtilis* hatte den Basencode `5-AgAgTgACAaggTggTgCAT-ggTTgTC-3.`

### 2.1.6 Verwendete *Aspergillus fumigatus* Primer und Sonden für den Mastermix

Der Primer für *Aspergillus fumigatus* AspF/P1 50 µM hatte den Basencode 5`-GCAGTCTGAGTTGATTATyGyAATC-3 und Primer Fung5,8/P2 50 µM hatte den Basencode 5`-CAGGGGGCGCAATGTGC-3`.

Die Sonde für *Aspergillus fumigatus* PFITS BHQ 24 µM hatte den Basencode FAM-CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA-TAM

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bakterien und Pilze

#### 2.2.1.1 Gewinnung der *Bacillus subtilis*-DNA

Die Gewinnung der *Bacillus subtilis*-DNA (Stamm: *Bacillus atropheus* ATCC 9372, Chargennummer 7 SU-W 10408/7-1) erfolgte nach dem Protokoll, das von J. Springer *et al.* [18] modifiziert wurde und unten ausführlich dargestellt wird. Alle Schritte der Extraktion wurden unter einer Class2 laminar flow Kabine getätigt. Es wurden *Bacillus subtilis* Konidien in ein 15 ml Falcongefäß gegeben. Zu den Konidien wurden Keramikperlen (MAGNA Lyser Green beads; Roche) und gereinigtes H<sub>2</sub>O gegeben. Das Falcon wurde bei maximaler Geschwindigkeit mit dem Vortexer für 1,5 min durchmischt. So sollten die Zellwände von *Bacillus subtilis* lysiert werden. Danach wurde 200 µl des Binding

Puffers und 50 µl der Proteinase K hinzugefügt. Diese wurden manuell durchmischt. Das Falcon wurde für 15 min in ein Wasserbad bei einer Temperatur von 70 °C gestellt. Nun wurden dem Falcon 100 µl Isopropanol zugegeben und per Vortexer durchmischt. Das gesamte Volumen wurde auf die Säule übertragen und für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Die Collection Tube, die sich unter der Säule befindet, wurde verworfen. Die Säule wurde auf eine neue Collection Tube gesetzt, und 500 µl des Inhibitor Removal Puffers zugegeben und für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Das Collection Tube wurde verworfen. Jetzt wurde eine neue Collection Tube unter die Säule geklemmt, dann 500 µl des Wash Puffers zugegeben und wieder bei 8000 g für 1 min zentrifugiert. Danach wurde noch einmal das Sammelgefäß verworfen und ein neues Sammelgefäß unter die Säule geklemmt. Es wurde wiederholt 500 µl Wash Puffer hinzugeben und für 2 min bei max. Geschwindigkeit ca. 16000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorfer-Gefäß gesetzt. Auf den Filter wurden 100 µl Elutionspuffer pipettiert und die Säule für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Anschließend konnte die Säule verworfen werden. Im Eppendorfer-Gefäß befand sich nun die aufgereinigte *Bacillus subtilis*-DNA, mit der die Verdünnungen für die Versuche angefertigt wurden.

#### 2.2.1.2 Bezug der *Aspergillus fumigatus*-DNA

In den Versuchen wurden ausschließlich genomische DNA von *Aspergillus fumigatus* (Stamm ATCC 46645) verwendet [10]. Die DNA wurde als gebrauchsfertige Lösung zur Verfügung gestellt und nach dem oben beschriebenen Protokoll isoliert (s. Punkt 2.2.1.1).



## 2.2.2 Serumproben

### 2.2.2.1 Blutentnahme und Gewinnung von Serumproben

Das Serum für die Versuche wurde aus Blutproben von freiwilligen Spendern entnommen (Ethikvotum Aktenzeichen 173/11). Die Voraussetzungen für die Blutspende waren ein intaktes Immunsystem und keine aktive Infektion mit *Aspergillus fumigatus*. Die Spender mussten erwachsen sein, Geschlecht und Alter spielten keine Rolle. Vor der Blutentnahme wurden die Testpersonen ausführlich über mögliche Risiken, wie Infektion, Gefäßverletzungen, Nervenschäden und Entstehung von Hämatomen informiert. Die Einwilligung zur Blutentnahme wurde von allen Testpersonen via Unterschrift eingeholt.

Das Blut wurde per Butterfly aus einer Armvene unter sterilen Bedingungen entnommen und in Serumröhrchen abgefüllt. Nach der Entnahme wurde das Blut direkt in der Zentrifuge für 10 min mit 3000 g zentrifugiert. Das Serum, das sich nun oberhalb der festen Blutbestandteile gesammelt hatte, konnte dann abgenommen und in je 2 ml Eppendorf-Gefäße gelagert werden. Die Serumproben wurden entweder direkt verwendet oder bei -20 C° im Gefrierfach gelagert.

### 2.2.2.2 Einbringen der DNA von *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* in Serumproben

Vor jedem Versuch wurde eine neue Verdünnungsreihe sowohl mit *Bacillus subtilis* als auch mit *Aspergillus fumigatus* angelegt. Dies geschah stets unter einer Class 2 laminar flow Kabine, die vor jedem Versuch für mindestens 20 min mit UV- Licht mit 320 nm bestrahlt wurde. Der Grund für das Anlegen neuer Verdünnungsreihen waren Veränderungen der Cq-Werte (quantification cycle [Cq]) bei niedrigen DNA-Verdünnungen, die sich schon nach wenigen Stunden und Tagen bemerkbar machten. Alle neu angelegten Verdünnungsreihen wurden vor jedem Versuch mittels Realtime PCR im StepOne plus getestet.

Es wurden in jede Serumprobe, außer der Negativkontrolle, je 10 µl der frisch hergestellten Verdünnungsreihen hinzugegeben.

Beispiel:

10 µl *Aspergillus fumigatus* Verdünnung mit  $10^2$  Kopien/µl und 10 µl *Bacillus subtilis* Verdünnung mit  $10^3$  Kopien/µl in 1 ml Serum.

### 2.2.2.3 Extraktion der *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis*-DNA aus Humanserum

Zur Gewinnung der DNA von *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* aus Humanserum wurde der QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen) verwendet.

Alle Schritte wurden in einer Class 2 laminar flow Kabine durchgeführt, wie bei den Versuchen mit Vollblut [18]. Vor jeder Extraktion wurde die Kabine für 30 min mit UV Licht mit 320 nm bestrahlt [25]. Zunächst wurde 1ml Serum auf Raumtemperatur aufgewärmt und in ein 2 ml Eppendorfer-Gefäß pipettiert, danach wurde der AC-Puffer zugegeben. Zu jeder Serumprobe wurde 0,8 ml AC-Puffer pipettiert und anschließend mit geschlossenem Deckel für 10 s bei maximaler Geschwindigkeit mit dem Vortexer durchmischt. Die durchmischten Proben wurden bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Wichtig war, dass die Serumproben eine max. Zeit von 15 min Inkubationszeit nicht überschritten. Die Proben wurden anschließend für 3 min bei 1200 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren bildete sich ein klarer Überstand im Eppendorf-Gefäß. Das entstandene Pellet am Grund des Eppendorf-Gefäßes durfte sich weder durch Drehung noch durch Bewegung verformen oder vom Grund lösen. Der klare Überstand wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurde das Pellet gelöst und zum gelösten Pellet wurden 300 µl AR-Puffer, der im Wasserbad auf 60 °C erwärmt worden war, hinzugegeben. Zusätzlich wurden 20 µl Proteinase K eingegeben. Die Proben wurde nun mittels Vortex bei maximaler Geschwindigkeit gründlich durchmischt, bis sich das Pellet vollständig aufgelöst hatte. Die Eppendorf-Gefäße wurden nun im Mixing Block bei 40 °C und 1500 rpm Schüttelgeschwindigkeit inkubiert. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert, damit sich der gesamte Gefäßinhalt am Grund sammelte. Jetzt wurden 300 µl des AB-Puffers hinzugegeben. Dann wurden alle Proben kurz zentrifugiert. Es wurden anschließend 700 µl Lysat aus den Eppendorfer-Gefäßen in die QIAamp Spin Säule pipettiert. Die Proben wurden bei 3000 g für eine Minute zentrifugiert. Die QIAamp Spin Säulen wurden nun in neue Sammelgefäße (Collection tubes) verbracht. Die alten Sammelgefäße mit Filtrat wurden verworfen. In die QIAamp Spin Säulen wurden 500 µl AW 1 Puffer hinzugegeben und für 1 min bei

6000 g zentrifugiert. Filtrat und Sammelgefäß wurden abermals verworfen. QIAamp Spin Säulen wurden auf neue Sammelgefäße übertragen. 500 µl AW-2-Puffer wurden in die QIAamp Spin Säule eingegeben und anschließend bei 16000 g für 4 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde wiederum verworfen und die QIAamp Spin Säule in ein 1,5 ml Eppendorfer-Gefäß gegeben. Um die Nukleinsäure zu eluieren, wurden nun 35 µl des AVE-Puffers auf die Membran der Säule pipettiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt wurden die Proben bei 6000 g für 2 min zentrifugiert. Für das zweite Eluat wurden danach die QIAamp Spin Säulen ein weiteres Mal auf ein neues 1,5 ml Eppendorfer-Gefäß übertragen, nochmals auf die Membran 35 µl AVE-Puffer pipettiert, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann wieder mit 6000 g für 3 min zentrifugiert, um die restliche Nukleinsäure zu eluieren.

### 2.2.3 PCR

#### 2.2.3.1 Zusammensetzung des optimierten Mastermixes für den Nachweis von *Bacillus subtilis*-DNA in der Real-Time PCR

Der Mastermix für die Real-Time PCR (PCR-Protokoll wie in 2.2.4.4 beschrieben) wurde durch verschiedene Versuche optimiert (beschrieben unter 3.1). In den Tabellen 1-3 sind die optimierten Mastermixzusammensetzungen aufgeführt.

In Tabelle 1 ist die Mastermixzusammensetzung für eine PCR im Monoplexformat aufgeführt, was bedeutet, dass nur Primer und Sonden für *Bacillus subtilis* enthalten sind und somit auch nur *Bacillus subtilis*-DNA detektiert werden konnte. In Tabelle 2 wird die Mastermixzusammensetzung für *Aspergillus fumigatus* im Monoplexformat dargestellt.

			<b>Konzentration</b>
<b>2xGEX oder Sso</b>		10 $\mu$ l	
<b>Primer <i>Bacillus s.</i></b>	16S-S 20 $\mu$ M	0,125 $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l
<b>Primer <i>Bacillus s.</i></b>	16S-A 20 $\mu$ M	0,125 $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l
<b>Sonde <i>Bacillus s.</i></b>	16S-TM 12 $\mu$ M	0,125 $\mu$ l	74 fmol/ $\mu$ l
<b>Probe (DNA-Input)</b>		10 $\mu$ l	
<b>Gesamtvolumen</b>		20,375 $\mu$ l	

**Tabelle 1. Mastermix für PCR im Monoplexformat von *Bacillus subtilis*.**

			<b>Konzentration</b>
<b>2xGEX oder Sso</b>		10 µl	
<b>Primer/1 <i>Aspergillus f.</i></b>	50 µM	0,125 µl	307 fmol/µl
<b>Primer/2 <i>Aspergillus f.</i></b>	50 µM	0,125 µl	307 fmol/µl
<b>Sonde <i>Aspergillus f.</i></b>	Pan Asp.-24 µM	0,125 µl	147 fmol/µl
<b>Probe (DNA-Input)</b>		10 µl	
<b>Gesamtvolumen</b>		20,375 µl	

**Tabelle 2. Mastermix für PCR im Monoplexformat von *Aspergillus fumigatus*.**

In der Tabelle 3 ist die Mastermixzusammensetzung für Duplexformat aufgelistet. Im Duplexformat sind Primer und Sonden von *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* enthalten. So kann DNA von *Aspergillus* und *Bacillus* in derselben Probe detektiert werden. Im Ergebnisteil werden von 3.2-3.3 alle Versuche im Monoplexformat durchgeführt. Ab 3.4 werden zusätzlich Versuche im Duplexformat aufgeführt.

			<b>Konzentration</b>
<b>2xGEX oder Sso</b>		10 µl	
<b>Primer/1 <i>Aspergillus f.</i></b>	50 µM	0,125 µl	301 fmol/µl
<b>Primer/2 <i>Aspergillus f.</i></b>	50 µM	0,125 µl	301 fmol/µl
<b>Sonde <i>Aspergillus f.</i></b>	Pan Asp.-24 µM	0,125 µl	145 fmol/µl
<b>Primer <i>Bacillus s.</i></b>	16S-S 20 µM	0,125 µl	120 fmol/µl
<b>Primer <i>Bacillus s.</i></b>	16S-A 20 µM	0,125 µl	120 fmol/µl
<b>Sonde <i>Bacillus s.</i></b>	16S-TM 12 µM	0,125 µl	72 fmol/µl
<b>Probe (DNA-Input)</b>		10 µl	
<b>Gesamtvolumen</b>		20,75 µl	

Tabelle 3. Mastermix für PCR im Duplexformat für *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis*.

### 2.2.3.2 Real-Time PCR

Der Nachweis der isolierten DNA von *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* wurde mit dem Step One Plus der Firma Life Technologies erbracht.

### 2.2.4 Aufbereitung der Proben für die Real-Time PCR und Umgebungsbedingungen

#### 2.2.4.1 Anlegen der Verdünnungsreihen mit *Bacillus subtilis*- und *Aspergillus fumigatus*-DNA

Vor jedem Versuch wurden neue Verdünnungsreihen angelegt. Alle Arbeitsschritte zur Anfertigung der Verdünnungsreihen erfolgten unter einer Class 2 laminar flow Kabine. Hierzu wurden von einer stabilen DNA-Verdünnung von  $10^5$  Kopien/ $\mu\text{l}$  jeweils  $10 \mu\text{l}$  in  $90 \mu\text{l}$  PCR-Wasser eingebracht. Danach wurde das Eppendorfer-Gefäß durch Vortexen gründlich durchmischt, um eine möglichst homogene Verteilung der DNA zu erhalten. Aus dieser Verdünnung wurden dann wieder  $10 \mu\text{l}$  entnommen und in ein neues Eppendorfer-Gefäß gegeben, das wiederum mit  $90 \mu\text{l}$  PCR-Wasser vorbereitet war. So wurden vor jedem Versuch Verdünnungsreihen erstellt, die bis zu 1 Kopie/ $\mu\text{l}$  DNA reichten.

#### 2.2.4.2 Umgebungsbedingungen, in denen der Mastermix für die Real-Time PCR erstellt wurde

Der Mastermix wurde unter einer Class 2 laminar flow Kabine erstellt, die sich in einem separaten Raum befand. Alle für den Mastermix benötigten Komponenten wurden in einem gesonderten Kühlschrank gelagert, sodass keine Kontamination der Verdünnungsreihen oder Blutproben durch *Aspergillus fumigatus*- oder *Bacillus subtilis*-DNA stattfinden konnte. Für die Versuche wurden verschiedene Ansätze an Mastermix erstellt, die je



nach Versuchsaufbau andere Zusammensetzungen und Mengen an Primer und Sonden enthielten.

#### 2.2.4.3 Umgebungsbedingungen, in denen die Proben für die Real-Time PCR pipettiert wurden

Der Mastermix für die Detektion von *Bacillus subtilis* bzw. *Aspergillus fumigatus* wurde unter der Class 2 laminar flow Kabine in PCR-8er Streifen eingebracht. Dies geschah wiederum in einem separaten Raum, in dem keine Serumextraktionen und kein Erstellen von Mastermix stattfanden. Die Eppendorfer-Gefäße mit der jeweiligen Verdünnung wurden erst unmittelbar vor der Eingabe geöffnet. Pro Ansatz wurden 10 µl der jeweiligen Verdünnung eingesetzt, so ergab sich ein Gesamtvolumen zwischen 20,375 µl im Monoplexformat und 20,75 µl beim Duplexformat. Danach wurden die Streifen zentrifugiert, damit sich der gesamte Inhalt am Grund befand und der Deckel nicht benetzt war. Nach Testung und Auswertung der Verdünnungsreihe im Real-Time Assays wurde die genomische DNA von *Aspergillus fumigatus* und die DNA von *Bacillus subtilis* in das Humanserum eingegeben und anschließend die DNA aufgereinigt.

Bei Versuchen mit wässriger Lösung musste keine DNA-Aufreinigung durchgeführt werden, so dass die Verdünnungsproben direkt in den für den Versuch vorbereiteten Mastermix eingebracht werden konnten.

#### 2.2.4.4 PCR-Protokoll

Die Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt: Aktivierung der Uracil-DNA Glycosidase (UDG) bei 50 °C für 2 min, danach Aktivierung der *Taq* Polymerase für 10 min bei 95 °C, gefolgt von 55 Zyklen mit Denaturierung 95 °C für 5 s, Primerhybridisierung 57 °C für 15 s und Elongation 72 °C für 1 s. Bei den Versuchen im Duplexformat wurde auf 60 Zyklen erhöht, ansonsten war das Amplifikationsprotokoll identisch.

Bei allen Versuchen, die mit dem StepOnePlus durchgeführt wurden, waren immer Negativkontrollen und Positivkontrollen enthalten. Von jeder Probe, die extrahiert wurde, wurden Triplikate analysiert. Bei der PCR mit 55 Zyklen wurden nur Cq-Werte bis 50 Zyklen in die Ergebnisse eingerechnet und dargestellt. Alle Cq-Werte darüber wurden als Ausreißer oder falschpositives Ergebnis gewertet. Bei der PCR mit 60 Zyklen wurden alle Cq-Werte bis 55 Zyklen gewertet und dargestellt.

Das folgende Schaubild 1 soll den Ablauf der Real-Time PCR vereinfacht darstellen.

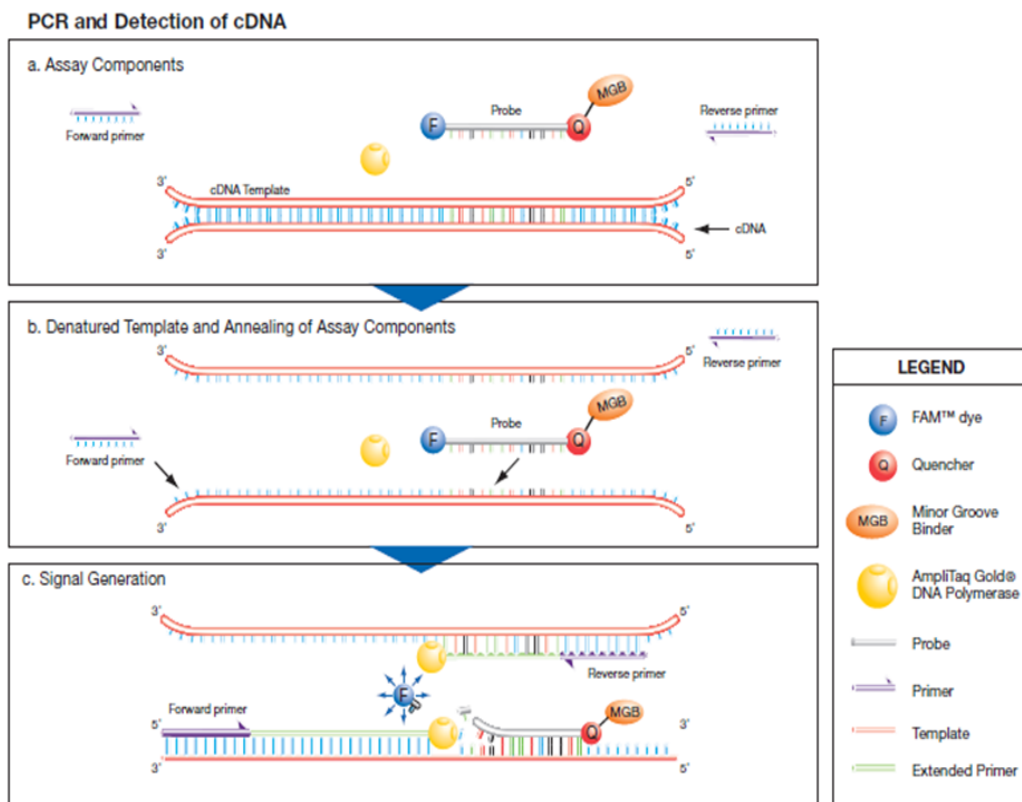


Abbildung 1. Schematische Darstellung der PCR und Detektion der DNA (Quelle: Manual: AB StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR Systems–Standard Curve Experiments 2010 Applied Biosystems)

### 3. Ergebnisse

Mehrere Ziele sollten mit den nachfolgenden Experimenten erreicht werden. Zuerst wurde die Zusammensetzung des Mastermixes in mehreren Versuchsreihen mit verschiedenen Ansätzen im Monoplex- und Duplexformat zur *Aspergillus fumigatus*-Detektion in Humanserum und wässriger Lösung getestet und optimiert.

Die dann folgenden Versuche hatten das Ziel, das ideale Elutionsvolumen nach der DNA-Aufbereitung von *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* zu ermitteln. Nachdem mit diesen Versuchen eine effiziente Mastermixzusammensetzung und das ideale Elutionsvolumen ermittelt werden konnten, wurde die Effizienz der DNA-Aufbereitung untersucht.

Weiter wurde versucht, eine Extraktionskontrolle mit *Bacillus subtilis* in die Probe zu integrieren, um so die Aussagekraft der extrahierten Probe zu evaluieren.

### 3.1 Versuche zur Optimierung des Mastermixes

Die Versuche zur Optimierung des Mastermixes hatte das Ziel, auf ein Mastermixvolumen von ca. 10  $\mu$ l pro Probe zu kommen. Es sollte eine minimale Primer- und Sondenmenge definiert werden, bei der noch ein stabiles Signal für *Bacillus subtilis*-DNA detektiert werden kann. Der ursprüngliche Mastermix wurde von Versuchen aus einer Arbeit mit Vollblut und Humanserum von Springer et al. übernommen [20].

Die Versuche zur Optimierung des Mastermixes wurden ausschließlich für *Bacillus subtilis*-DNA durchgeführt, die Mengen an *Aspergillus fumigatus* Primer und Sonden wurden belassen. Um die Detektionsgrenze bestimmen zu können, wurden Verdünnungsreihen mit *Bacillus subtilis* Primer und Sonden angefertigt. Es wurde eine Real-Time PCR mit immer gleichen Mengen an *Bacillus subtilis*-DNA (gelöst in 10  $\mu$ l pro Probe) durchgeführt. Die Verdünnungen/Euate wurden immer komplett getestet (siehe Tabelle 4 und 5). Bei allen hier dargestellten Versuchen wurden immer auch Negativkontrollen mitgeführt, um eine Kontamination während der Aufbereitung auszuschließen.

#### 3.1.1 Versuche mit Verdünnungsreihen von *Bacillus subtilis* Primer und Sonden

Es wurden Versuche mit verschiedenen Mengen an Primer und Sonden und immer gleichbleibender DNA-Menge (15000 Kopien klonierter DNA von *Bacillus subtilis*) durchgeführt. In Tabelle 4 wird der Versuchsaufbau für die Verdünnung von *Bacillus subtilis* Primer 16S-S(reverse) dargestellt. Die entsprechende Primermenge wird dabei schrittweise um die Hälfte reduziert.

<b>Mastermix</b>	<b>Konzentration Primer Bac. s. 16S-S 20µM</b>	<b>Konzentration Primer Bac.s. 16A-S 20µM</b>	<b>Konzentration Sonde Bac. s. 16S TM-12µM</b>	<b>Konzentration <i>Bacillus s.</i> DNA</b>
<b>Probe 1</b>	491 fmol/µl	246 fmol/µl	294 fmol/µl	15000 Kopien
<b>Probe 2</b>	246 fmol/µl	246 fmol/µl	294 fmol/µl	15000 Kopien
<b>Probe 3</b>	123 fmol/µl	246 fmol/µl	294 fmol/µl	15000 Kopien
<b>Probe 4</b>	61 fmol/µl	246 fmol/µl	294 fmol/µl	15000 Kopien
<b>Probe 5</b>	31 fmol/µl	246 fmol/µl	294 fmol/µl	15000 Kopien

**Tabelle 4. Mastermixzusammensetzung für die Verdünnungsreihen von *Bacillus subtilis* Primer 16S-S.**

Ergebnis für die Versuche mit dem 16S *Bacillus subtilis* Primern war, dass sich erst ab einer Konzentration von 61 fmol/µl der Cq-Wert von 31,6 Zyklen im Mittel auf 40,1 Zyklen erhöhte und bei noch niedrigerer Konzentration nichts mehr detektiert werden konnte, siehe Tabelle 6. Um ein möglichst kleines Volumen für den Mastermix zu erhalten, wurde die Konzentration des *Bacillus subtilis*-Primerstocks verdoppelt.

Der gleiche Versuchsaufbau (Tabelle 5) wurde für die Konzentration von *Bacillus subtilis*-Primer 16S-A(forward) gemacht. Bei den Versuchen bis zu einer Konzentration von 246 fmol/µl ergaben sich Cq-Werte im Mittel bei 31,5 Zyklen und bei 123 fmol/µl ein Cq-Wert im Mittel von 31,4 Zyklen, siehe Tabelle 6. Auch bei *Bacillus subtilis*-Primer

16S-A(forward) wurde die Konzentration des *Bacillus subtilis*-Primerstocks 16S-A(forward) verdoppelt. Die ideale Menge *Bacillus subtilis*-Primer war nach diesen Versuchen 123 fmol/ $\mu$ l *Bacillus subtilis* 16S-S(reverse) und 123 fmol/ $\mu$ l *Bacillus subtilis* 16S-A(forward) im Monoplexformat. Im Duplexformat (Tabelle 10) sind es dann 120 fmol/ $\mu$ l für Primer 16S-A(forward) und 16S-S(reverse). In Tabelle 6 werden die Ergebnisse für Verdünnungen von *Bacillus subtilis* Primer 16 S-S(forward) und 16 S-A(reverse) zusammengefasst.

<b>Mastermix</b>	<b>Konzentration Primer Bac. s. 16S-A 20<math>\mu</math>M</b>	<b>Konzentration Primer Bac.s. 16S-S 20<math>\mu</math>M</b>	<b>Konzentration Sonde Bac. s. 16S TM-12<math>\mu</math>M</b>	<b>Konzentration <i>Bacillus s.</i> DNA</b>
<b>Probe 1</b>	491 fmol/ $\mu$ l	246 fmol/ $\mu$ l	294 mol/ $\mu$ l	15000 Kopien
<b>Probe 2</b>	246 fmol/ $\mu$ l	246 fmol/ $\mu$ l	294 fmol/ $\mu$ l	15000 Kopien
<b>Probe 3</b>	123 fmol/ $\mu$ l	246 fmol/ $\mu$ l	294 fmol/ $\mu$ l	15000 Kopien
<b>Probe 4</b>	61 fmol/ $\mu$ l	246 fmol/ $\mu$ l	294 fmol/ $\mu$ l	15000 Kopien
<b>Probe 5</b>	31 fmol/ $\mu$ l	246 fmol/ $\mu$ l	294 fmol/ $\mu$ l	15000 Kopien

**Tabelle 5. Mastermixzusammensetzung für die Verdünnungsreihen von *Bacillus subtilis* Primer 16S-A.**

Konzentration in fmol/ $\mu$ l	Cq-Werte Primer 16S-S	Cq-Werte Primer 16S-A
<b>246</b>	31,9 Zyklen	31,6 Zyklen
<b>123</b>	32,5 Zyklen	31,4 Zyklen
<b>61</b>	40,8 Zyklen	42,6 Zyklen
<b>31</b>	Nicht detektiert	Nicht detektiert

Tabelle 6. Darstellung der Cq-Werte, die mit 15000 Kopien *Bacillus subtilis* in wässriger Lösung und mit verschiedenen Mengen von *Bacillus subtilis*-Primer in der PCR mit 55 Zyklen gemessen wurden.

Nachdem die Primer-Mengen für den Nachweis von *Bacillus subtilis*-DNA festgelegt werden konnte, wurde die Sonde für *Bacillus subtilis* in Versuchen mit diversen Mengen getestet. Tabelle 7 zeigt die hier verwendeten Mastermixzusammensetzungen.

<b>Mastermix</b>	<b>Konzentration Sonde Bac. s. 16S TM-12<math>\mu</math>M</b>	<b>Konzentration Primer Bac.s. 16A-S 20<math>\mu</math>M</b>	<b>Konzentration Primer Bac. s. 16S-S 20<math>\mu</math>M</b>	<b>Konzentration Bacillus s. DNA</b>
<b>Probe 1</b>	294 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	15000 Kopien
<b>Probe 2</b>	147 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	15000 Kopien
<b>Probe 3</b>	74 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	15000 Kopien
<b>Probe 4</b>	37 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	15000 Kopien
<b>Probe 5</b>	18 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	123 fmol/ $\mu$ l	15000 Kopien

**Tabelle 7. Mastermixzusammensetzung für Verdünnungen von *Bacillus subtilis* Sonden 16S TM.**

Bei der *Bacillus subtilis*-Sonde 16S TM waren die C<sub>q</sub>-Werte bis zu einer Konzentration von 74 fmol/ $\mu$ l bei 31,0 Zyklen stabil (Tabelle 8). Aus praktischen Gründen wurde auch hier die Konzentration des *Bacillus subtilis*-Sondenstocks verdoppelt.



Konzentration in fmol/ $\mu$ l	Cq-Werte Sonde Bac 16S TM
147	31,1 Zyklen
74	31,0 Zyklen
37	31,9 Zyklen
18	Nicht detektiert

Tabelle 8. Darstellung der Cq-Werte von diversen Mengen von *Bacillus subtilis*-Sonden bei 15000 Kopien *Bacillus subtilis*-DNA in wässriger Lösung in der PCR mit 55 Zyklen

Während der Versuchsreihen kam es zu Lieferschwierigkeiten des GEX-Mastermixes. Die neuen Chargen (Charge 1110130) hatten deutlich negative Auswirkungen auf die Cq-Werte. Diese waren deutlich höher und bei niedrigen Konzentrationen von *Aspergillus fumigatus*-DNA kam es zu instabilen Messergebnissen. Infolgedessen wurde auf den Sso-Mastermix umgestellt. Dieser wurde ebenfalls mit 10  $\mu$ l pro Ansatz eingesetzt.

### 3.1.2 Testung des Mastermixes für Real-Time PCR im Duplexformat

Um eine Beeinflussung zwischen *Aspergillus fumigatus*- und *Bacillus subtilis*-PCR-Assay festzustellen, wurden zum *Bacillus subtilis*-Mastermix je *Aspergillus fumigatus* Primer 1, 2 und eine entsprechenden Sonde zugegeben. Zusammensetzung der Proben und des Mastermixes ist in Tabelle 9 dargestellt.

	Konzentrationen fmol/µl						
<b>Master-mix</b>	<b>Sonde Bac. s. 16S TM- 12 µM</b>	<b>Primer Bac.s. 16A-S 20 µM</b>	<b>Primer Bac. s. 16S-S 20 µM</b>	<b>Sonde Asp PFITS BHQ 24 µM</b>	<b>Primer Asp AspF/P 1 50 µM</b>	<b>Primer Asp Fung5, 8/P2 50 µM</b>	<b><i>Bacillus subtilis</i> DNA</b>
<b>Probe 1</b>	72	120	120	ohne	ohne	ohne	15000 Ko- pien
<b>Probe 2</b>	72	120	120	ohne	ohne	ohne	15000 Ko- pien
<b>Probe 3</b>	72	120	120	144	301	301	15000 Ko- pien
<b>Probe 4</b>	72	120	120	144	301	301	15000 Ko- pien

**Tabelle 9. Mastermixzusammensetzung (Duplexformat) zur Testung der Interaktion von zwei verschiedenen Assays zum Nachweis von *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis*.**

Der Cq-Wert lag unverändert mit 15000 Kopien *Bacillus subtilis*-DNA pro Ansatz im Mittel bei 32,2 Zyklen, siehe Tabelle 10. Es wurden 4 Versuche durchgeführt. Es kam zu einer Cq-Werterhöhung um ca. 0,7 Zyklen bei den Proben mit Duplexmastermix. Diese lässt am ehesten auf einen Verdünnungseffekt schließen, der durch das zusätzliche Volumen von 0,375 µl zustande kommt. Eine mögliche Inhibition scheint nicht der Fall zu sein, da die Cq-Werte in allen Versuchen mit *Aspergillus fumigatus*-Primer 1 und 2 stabil

waren. Für diese Versuche wurden dieselben Mengen an Primer und Sonden wie im Monoplexformat benutzt.

<b>15000 Kopien <i>Bacillus subtilis</i> in 10 µl + Monoplexformat mit Mastermixvolumen von 10,375 µl</b>	31,5 Zyklen
<b>15000 Kopien <i>Bacillus subtilis</i> in 10 µl + Duplexformat mit Mastermixvolumen von 10,75 µl</b>	32,2 Zyklen

**Tabelle 10. Vergleich der Testergebnisse von Monoplex- und Duplexformatmastermix. Die Mittelwerte wurden aus vier Versuchen mit dem Versuchsaufbau ermittelt.**

### 3.2 Einfluss verschiedener Elutionsvolumina auf die extrahierte DNA-Gesamtmenge

Im Folgenden wurden verschiedene Elutionsvolumina (100 µl, 65 µl und 35 µl) getestet. Mit den Versuchen sollte die Detektionsgrenze für *Bacillus*-DNA weiter gesenkt werden. Hierzu wurde im letzten Schritt der DNA-Aufbereitung von *Bacillus subtilis* die Nukleinsäure mit verschiedenen Volumina von AVE-Puffer aus den Membranen eluiert. Die Versuche wurden im Monoplexformat für *Bacillus subtilis* (siehe Mastermix Tabelle 1) durchgeführt. Zuvor wurden 15000 Kopien *Bacillus subtilis*-DNA in 3 Proben mit je einem Milliliter Humanserum eingegeben und nach dem modifizierten Protokoll von J. Springer *et al.* [26] aufbereitet (Protokoll siehe 2.2.2.3).

Bei 35 µl Elutionsvolumen lag der Mittelwert der Cq-Werte bei 34,9 Zyklen. Der Mittelwert der Cq-Werte bei 65 µl Elutionsvolumen lag bei 36,0 Zyklen, bei 100 µl Elutionsvolumen betrug der Mittelwert 36,6 Zyklen. Hierzu wurden 4 Versuche in derselben Versuchsanordnung durchgeführt. In allen Versuchen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Elutionsvolumina. Abschließend kann gesagt werden, dass die Cq-Werte niedriger wurden, je weniger Elutionsvolumen benutzt wurde (Abbildung 2).

Zu untersuchen war eine mögliche Konzentrationserhöhung der DNA durch ein auf 35 µl verringertes Elutionsvolumen. Es wurde immer das gesamte Eluat (3 Replikate a 10 µl) getestet, um so möglichst kleine Mengen an DNA nachzuweisen. Dabei wurden jeweils 10 µl pro Probe in den vorbereiteten Mastermix eingegeben. Somit konnte ein Eluat dreimal getestet werden. Ein Elutionsvolumen von 35 µl erwies sich als vorteilhaft für die Serumextraktion, da so die Detektionsgrenze gesenkt und damit die Sensitivität erhöht werden konnte.

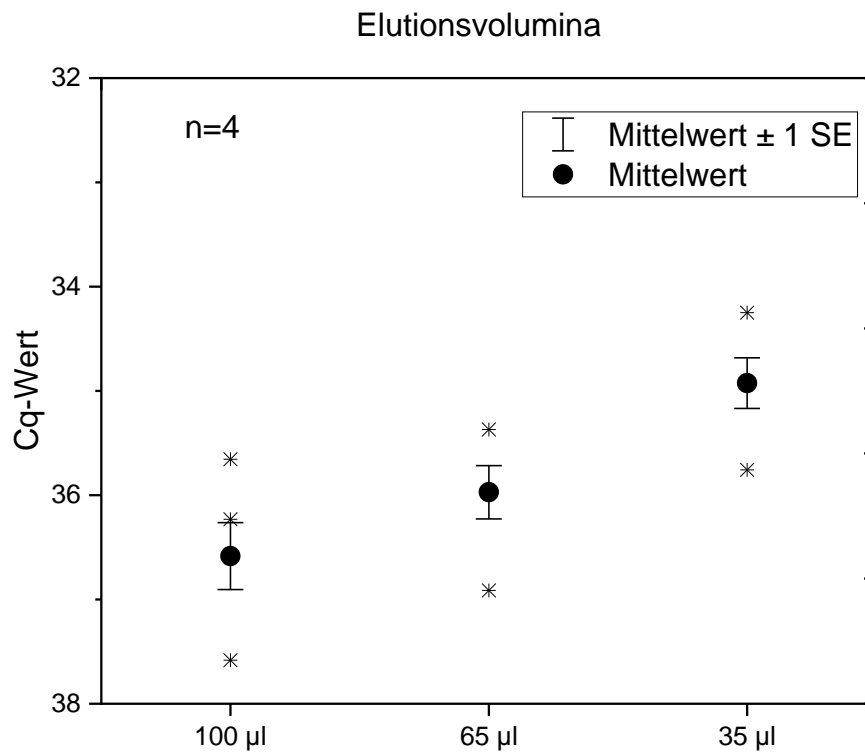


Abbildung 2. Vergleich der Elutionsvolumina. In der Abbildung sind 4 Versuche mit der gleichen Versuchsanordnung exemplarisch dargestellt. Die PCR wurde mit 55 Zyklen durchgeführt. Die Standardabweichung wurde in der Darstellung mit SE abgekürzt.

### 3.3 Testung extrahierter Proben (Humanserum mit *Aspergillus fumigatus*-DNA und *Bacillus subtilis*-DNA) im Monoplexformat

In diesen Versuchen wurde Humanserum von gesunden Probanden verwendet (siehe 2.2.2.1). Die Serumproben wurden direkt nach der Entnahme oder aus dem Gefrierfach, wo die Proben bei -20 °C gelagert waren, verwendet. Diese wurden vor der Aufbereitung mit genomischer *Aspergillus fumigatus*-DNA oder mit *Bacillus subtilis*-DNA versetzt. Verschiedene Chargen an GEX-Mastermix wurden benutzt und miteinander verglichen. Vor jedem Versuch wurden frische Verdünnungen von *Aspergillus fumigatus*-DNA und *Bacillus subtilis*-DNA in wässriger Lösung angefertigt und mit dem StepOne Plus

getestet. Diese wurden als initiale Qualitätskontrolle benutzt. Nur wenn die Cq-Werte der getesteten Verdünnungsreihen stabil waren, wurden diese in die Serumproben eingegeben. Danach wurden die Serumproben mit dem QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen) nach dem modifizierten Protokoll von J. Springer *et al.* aufbereitet [18] (siehe 2.2.2.3). Von jeder aufbereiteten Serumprobe wurden Triplikate a 10µl sowohl für *Aspergillus fumigatus* (Mastermix siehe Tabelle 2) als auch für *Bacillus subtilis* (Mastermix siehe Tabelle 1) getestet.

### 3.3.1 Testung eines zweiten Eluates derselben Humanserumprobe

Die Überlegung hinter diesem Versuch war, dass eventuell DNA beim letzten Schritt der DNA-Aufbereitung im Filter zurückbleiben könnte. Deshalb wurde der Filter nacheinander mit je 35 µl AVE-Puffer ausgewaschen (siehe Extraktionsprotokoll 2.2.2.3). Es konnten aus dem 35 µl Eluat drei Proben mit je 10 µl Eluat gewonnen und miteinander verglichen werden (siehe Abbildung 3). Bei diesen Versuchen wurden in die erste Serumprobe vor der Extraktion  $10^4$  Kopien und in die zweite Serumprobe  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus*- oder *Bacillus subtilis*-DNA eingegeben und anschließend extrahiert. Für die Real-Time PCR wurde der GEX-Mastermix im Monoplexformat (siehe Tabelle 1 und 2) verwendet.

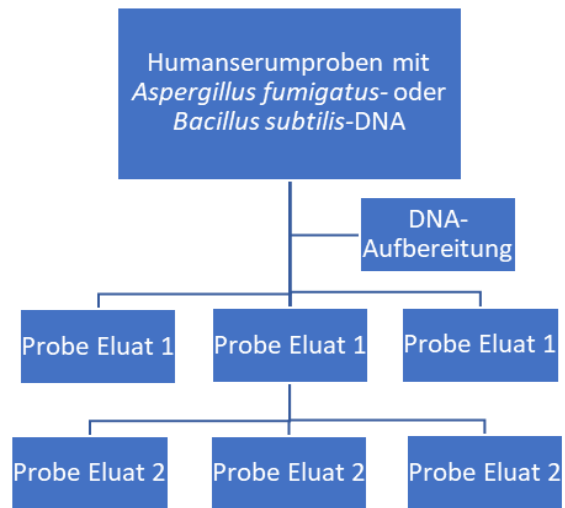


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Aufbereitung von DNA für die PCR und Erstellen von zwei Eluaten aus einer Humanserumprobe.

### 3.3.1.1 Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von *Aspergillus fumigatus*-DNA

Bei den Versuchen mit  $10^4$  Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA konnte bei den hier dargestellten Versuchen ein Mittelwert von 35,4 Zyklen erreicht werden. Im zweiten Eluat war der Mittelwert nur bei 39,0 Zyklen (siehe Abbildung 4). Wenn man die Versuche, in denen es im ersten Eluat einen Komplettausfall gab, als Ausreißer ausschließt, unterscheiden sich die Mittelwerte vom ersten und zweiten Eluat um 1,8 Zyklen (Originaldaten siehe Tabelle 11), was bedeuten würde, dass im Vergleich zum zweiten Eluat die ca. vierfache Menge an DNA im ersten Eluat aus dem Filter ausgewaschen wurde. Durch die Restmenge, die nach der Extraktion im Filter zurückbleibt, wird der Cq-Wert vergrößert, was bei niedrigen DNA-Mengen dann zu negativen Ergebnissen führt. Bei eingesetzten  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA unterschieden sich das erste Eluat vom zweiten um 3,4 Zyklen (ca. 8-fache Menge) im Mittel. Bei zwei Versuchen war der Cq-Wert des zweiten Eluats im Mittel 1,9 Zyklen niedriger als der Cq-Wert im ersten Eluat.

Das Ergebnis dieser Untersuchung war, dass sich bei großen Mengen eingesetzter DNA im zweiten Eluat immer noch eine hohe Anzahl an DNA-Kopien nachweisen ließ. Dies bestätigte sich bei  $10^4$  Kopien und auch bei  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus*. Bei einigen Versuchen kam es zu Instabilitäten der Cq-Werte, die sowohl bei  $10^4$  Kopien als auch bei  $10^3$  Kopien im ersten wie auch im zweiten Eluat nachweisbar waren. Cq-Wertinstabilitäten zeigten sich in Abhängigkeit von verschiedenen GEX-Chargen. Bei den neueren Chargen (Charge 1110130) waren die Cq-Werte teilweise deutlicher erhöht, was bei niedrigen DNA-Konzentrationen zu Instabilität und zu falschnegativen Ergebnissen führte. Bei zwei von acht Versuchen konnte keine DNA im zweiten Eluat nachgewiesen werden, was sich jedoch in den folgenden sechs Versuchen nicht bestätigte. Bei vier von acht Vergleichsproben kam es im zweiten Eluat zu niedrigeren Cq-Werten als im ersten Eluat. Erklären ließ sich dieses Phänomen am ehesten durch die längere Inkubationszeit, die durch das zweimalige Benetzen der Membran mit AVE-Puffer beim zweiten Eluieren



zustande kommt oder durch die schwankenden Cq-Werte und Cq-Wertinstabilität bei den neueren GEX-Mastermix-Chargen (Charge 1110130).

<b>Eluat 1</b> <b>10<sup>4</sup> Kopien</b>	<b>Eluat 2</b> <b>10<sup>4</sup> Kopien</b>	<b>Eluat 1</b> <b>10<sup>3</sup> Kopien</b>	<b>Eluat 2</b> <b>10<sup>3</sup> Kopien</b>
31,996	32,462	33,668	35,632
31,241	32,216	34,126	36,89
31,316	32,513	34,99	42,36
31,147	30,552	34,388	49,3
31,205	31,048	34,285	45,796
30,921	31,28	42,43	45,62
41,33	49,55	42,35	45,73
39,29	44,93	43,11	39,94
41,95	49,93	45,45	39,92
35,85	36,12	41,63	n.d.
36,45	36,87	n.d.	n.d.
35,78	36,22	n.d.	n.d.
n.d.	44,59	n.d.	41,63
n.d.	42,85	n.d.	39,93
n.d.	41,63	n.d.	44,95
n.d.	43,68	n.d.	44,63
n.d.	38,01	n.d.	43,5
n.d.	38,72	n.d.	n.d.
42,528	39,395	42,508	40,467
n.d.	42,345	n.d.	n.d.
n.d.	43,21	n.d.	n.d.
Mittelwert 35,4	Mittelwert 39,0	Mittelwert 39,0	Mittelwert 42,4

**Tabelle 11. Ergebnisse bei der Testung von erstem und zweitem Eluat nach Aufbereitung von Humanserum unter Verwendung von *Aspergillus fumigatus*. „n.d.“ bedeutet „nicht detektiert“. 1 ml Humanserum wurde mit *Aspergillus fumigatus* DNA versetzt und danach aufbereitet. Am Ende der Aufbereitung wurde zweimal mit AVE-Puffer eluiert.**

Dieses Phänomen wurde in Abbildung 4 aber nicht verdeutlicht, da nur der Mittelwert aller Versuche dargestellt wurde, aber nicht die Eluate aus derselben Extraktion im direkten Vergleich. Die Vermutung, dass eine größere Anzahl an DNA-Kopien im Filter zurückbleibt, lässt sich durch die hohen Cq-Werte vom zweiten Eluat belegen.

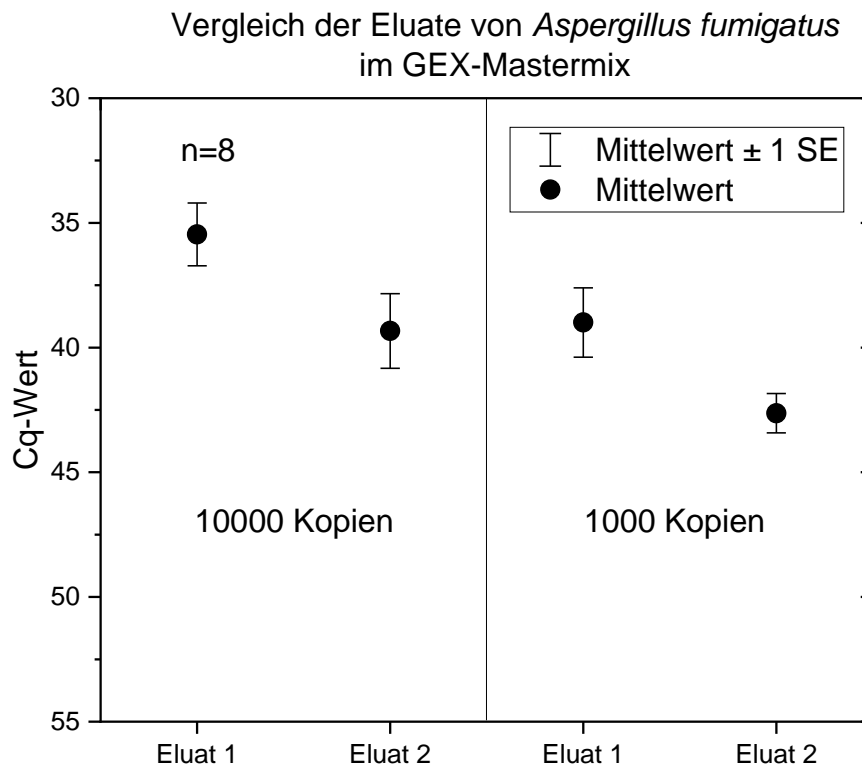


Abbildung 4. Vergleich von erstem und zweitem Eluat mit je 35 $\mu$ l AVE Puffer für *Aspergillus fumigatus*. Dargestellt sind hier 8 Versuche mit Proben von aufbereiteter *Aspergillus fumigatus*-DNA, die zuvor in Humanserum eingegeben wurde. Es wurden pro Eluat je 3 Replikate getestet.

### 3.3.1.2 Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung von Humanserumproben mit *Aspergillus fumigatus*

Bei diesen Versuchen wurde die Extraktionseffizienz der Serumaufbereitung untersucht. Hierzu wurden Verdünnungsreihen erstellt, direkt in der PCR auf Konsistenz getestet, Proben mit diversen DNA-Mengen versehen und extrahiert. Die initial erhaltenen Cq-

Werte wurden mit den Cq-Werten nach der Extraktion verglichen. Die Versuche wurden im Monoplexformat durchgeführt. Es wurden im selben Versuchslauf immer Verdünnungsreihen in wässriger Lösung und Proben aus der Humanserumextraktion getestet. Es wurden Triplikate jeder Verdünnungsreihe und aufbereiteter DNA getestet (siehe Abbildung 5).

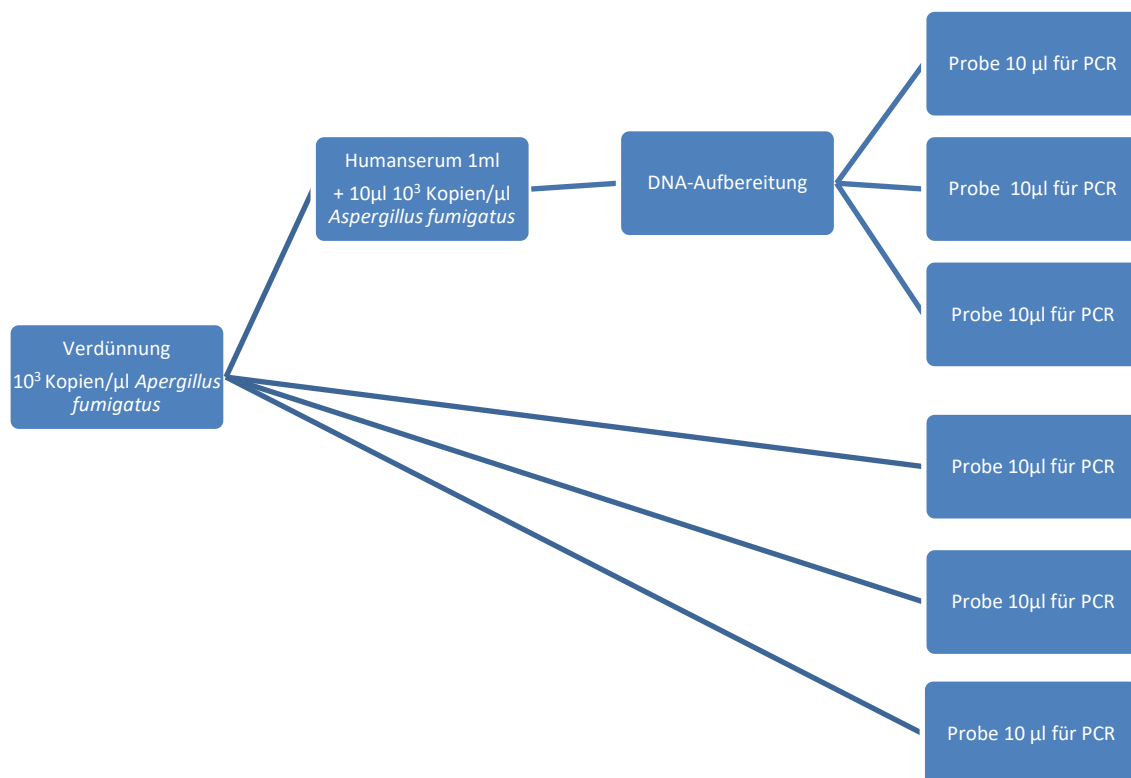


Abbildung 5. Versuchsaufbau zur Testung der Extraktionseffizienz bei der Aufbereitung von Humanserum bei einer definierten Menge an DNA.

Hier kam es zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, die, wie es scheint, auch in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Chargen des GEX-Mastermixes stehen. Um dies darzustellen, wurde ein Faktor generiert, der sich aus Cq-Wert der Verdünnungsreihe minus

Cq-Wert der aufbereiteten Serumprobe errechnet. Dieser stellt ein Maß für die Extraktionseffizienz dar, je kleiner desto besser. Während in den ersten Versuchen im Monoplex-format ein Faktor von im Mittel 2,7 entstand, wurde dieser mit den neueren Chargen (Charge 1110130) von GEX-Mastermix nicht mehr erreicht. Hier war nur noch ein Faktor von im Mittel 7,6 zu erzielen. Ein Unterschied in der Extraktionseffizienz zwischen den hier eingegebenen DNA-Mengen von  $10^3$  Kopien und  $10^4$  Kopien konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 6). Auf Grund der schlechteren Qualität der neueren GEX-Chargen (Charge 1110130; Ergebnisse nicht dargestellt) wurden die Versuche mit Sso-Mastermix wiederholt (siehe hierzu Kapitel ab 3.3.2.2 bis 3.3.3.2 mit Abbildung 10-14). Der dort verwendete Sso-Mastermix lieferte einen Faktor von 3,6 im Mittel und konnte damit an die ersten GEX-Chargen anschließen (siehe Abbildung 13).

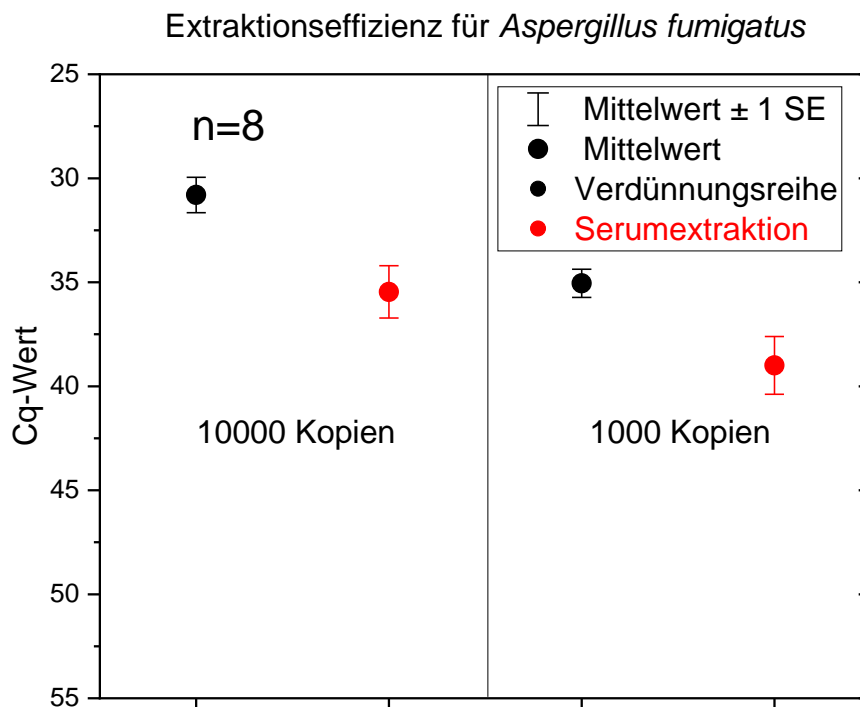


Abbildung 6. Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung aus Humanserum mit *Aspergillus fumigatus*. Alle hier dargestellten Versuche wurden mit GEX-Mastermix durchgeführt, die PCR mit 55 Zyklen. Die Standardabweichung wurde mit SE abgekürzt.

### 3.3.1.3 Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von *Bacillus subtilis*-DNA

Für die Versuche wurden Verdünnungsreihen mit *Bacillus subtilis* angelegt. Diese wurden, nachdem sie gemeinsam mit den Verdünnungsreihen von *Aspergillus fumigatus* getestet waren, in die Serumprobe eingegeben. Hier wurden, wie bei den Proben mit *Aspergillus fumigatus*, ebenfalls zwei Eluate mit je 35 µl AVE Puffer erzeugt und miteinander verglichen.

Beim ersten Eluat wurde für  $10^4$  Kopien ein Mittelwert von 38,7 Zyklen erreicht, im zweiten Eluat war der Cq-Wert im Mittel bei 39,0 Zyklen. Bei  $10^3$  Kopien war bei diesen Versuchen der Cq-Mittelwert bei 41,7 Zyklen im ersten Eluat und im zweiten Eluat bei 41,0 Zyklen. Wie schon bei *Aspergillus fumigatus* ergaben sich bei den Eluaten nur geringe Unterschiede bei den Cq-Werten. Eluat 1 und Eluat 2 hatten bei einer DNA-Menge von  $10^4$  Kopien eine Differenz von 0,3 Zyklen. Bei  $10^3$  Kopien lag die Differenz zwischen Eluat 1 und Eluat 2 bei 0,7 Zyklen. In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass bei  $10^3$  Kopien *Bacillus subtilis* im zweiten Eluat im Mittel sogar niedrigere Cq-Werte gemessen wurden als im ersten Eluat. Wie schon zuvor bei *Aspergillus fumigatus* kam es auch bei *Bacillus subtilis* zu Instabilitäten der Cq-Werte mit kompletten Ausfällen des ersten Eluats und positiven Ergebnissen für das zweite Eluat. Auch Cq-Wertausreißer nach oben und unten, die weit außerhalb der üblichen Norm von Cq-Wertschwankungen waren, waren im Zusammenhang mit den neueren Chargen (Charge 1110130) des GEX-Mastermixes darstellbar (siehe Tabelle 12), die weniger deutlich ausfielen. Es konnte auch hier gezeigt werden, dass eine sehr große Menge von *Bacillus subtilis*-DNA im Filter zurückbleiben muss, da sonst im zweiten Eluat nicht ähnliche oder sogar niedrigere Cq-Werte messbar wären.

Vergleich der Eluate von *Bacillus subtilis* im GEX- Mastermix

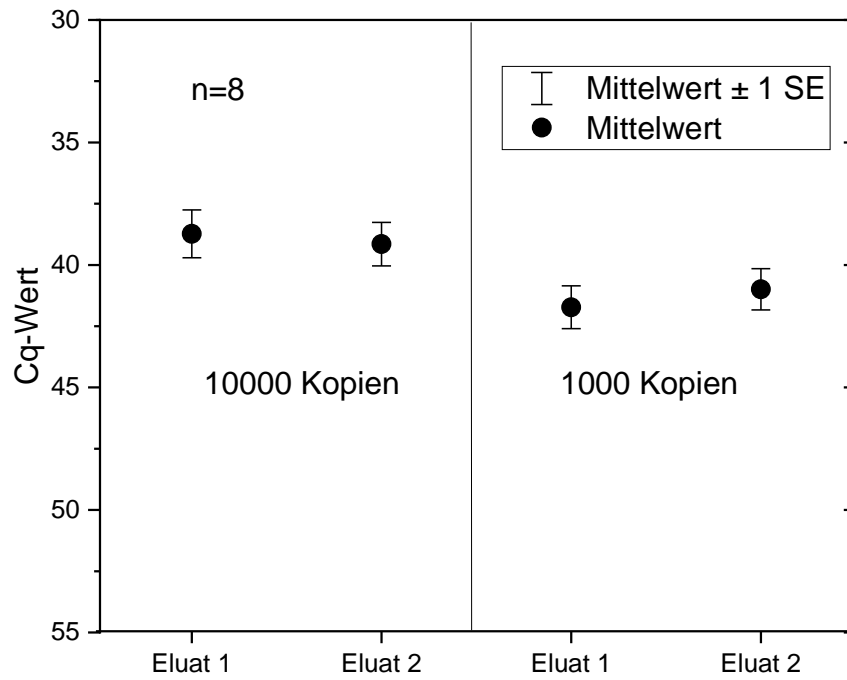


Abbildung 7. Vergleich von erstem und zweitem Eluat mit 35 µl AVE Puffer mit *Bacillus subtilis*. Die hier dargestellten Versuche wurden alle mit GEX-Mastermix durchgeführt. Die PCR wurde mit 55 Zyklen durchgeführt. Die Standardabweichung wurde mit SE abgekürzt. Es wurden je Eluat 3 Replikate getestet.

<b>Eluat 1</b> <b>10<sup>4</sup> Kopien</b>	<b>Eluat 2</b> <b>10<sup>4</sup> Kopien</b>	<b>Eluat 1</b> <b>10<sup>3</sup> Kopien</b>	<b>Eluat 2</b> <b>10<sup>3</sup> Kopien</b>
35,733	37,991	38,829	42,318
34,41	39,95	38,996	42,35
35,856	37,632	39,346	41,96
34,719	38,011	39,898	40,012
n.d.	n.d.	38,415	39,936
n.d.	n.d.	n.d.	38,55
37,43	n.d.	41,13	n.d.
36,92	n.d.	42,46	n.d.
36,35	n.d.	n.d.	n.d.
39,89	39,7	43,7	43,03
40,04	--	44,37	42,3
40,56	--	43,31	41,653
43,32	n.d.	n.d.	n.d.
44,02	n.d.	n.d.	n.d.
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
n.d.	37,46	n.d.	39,39
n.d.	37,35	n.d.	39,44
n.d.	37,16	n.d.	38,18
n.d.	44,355	48,841	45,355
44,219	41,152	41,439	40,222
<b>Mittelwert</b> 38,7	<b>Mittelwert</b> 39,0	<b>Mittelwert</b> 41,7	<b>Mittelwert</b> 41,0

**Tabelle 12. Ergebnisse bei der Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von *Bacillus subtilis*. „n.d.“ bedeutet „nicht detektiert“. 1 ml Humanserum wurde mit *Bacillus subtilis* DNA versetzt und danach aufbereitet. Am Ende der Aufbereitung wurde der Filter zweimal mit AVE-Puffer eluiert.**

#### 3.3.1.4 Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung von Humanserumproben mit *Bacillus subtilis*

In diesen Versuchen wurde der Verlust an DNA durch die Aufreinigung der Serumproben evaluiert. Wie schon bei den Versuchen mit *Aspergillus fumigatus* wurde auch hier ein Faktor generiert, um die Extraktionseffizienz darzustellen. Der Faktor berechnet sich aus Cq-Wert der eingegebenen *Bacillus subtilis*-DNA-Menge minus dem Cq-Wert des Serumextrakts der eingegebenen *Bacillus subtilis*-DNA. Alle Versuche wurden im Multiplexformat durchgeführt (Tabelle 1 unter 2.2.3.1). Der Versuchsaufbau war derselbe wie in Abbildung 5.

Hier konnte ein Faktor im Mittel bei  $10^4$  Kopien eingespikter *Bacillus subtilis*-DNA von 4,0 verzeichnet werden. Bei einer Kopien-Anzahl von  $10^3$  Kopien wurde ein Faktor von 5,3 errechnet. Die neueren Chargen (Charge 1110130) von GEX-Mastermix haben auch bei diesen Versuchen einen deutlichen Einfluss auf die Cq-Werte, diese führten wie schon bei *Aspergillus fumigatus* zu höheren Cq-Werten und Instabilitäten. Bei der Serumextraktion mit  $10^4$  Kopien im Mittel und älteren GEX-Chargen wurde ein Cq-Wert von 35,9 Zyklen erreicht, während bei gleicher Anzahl DNA-Kopien mit neueren GEX-Chargen (Charge 1110130) nur noch ein Cq-Wert im Mittel von 41,7 Zyklen erzielt wurde. Bei der Serumextraktion mit  $10^3$  Kopien wurde bei den älteren GEX-Chargen ein Cq-Wert im Mittel von 39,9 Zyklen erzielt, während mit den neueren GEX-Chargen (Charge 1110130) nur noch ein Cq-Wert im Mittel von 44,3 Zyklen erreicht werden konnte. In Abbildung 8 wurden die Mittelwerte aller Versuche (n=8) dargestellt.



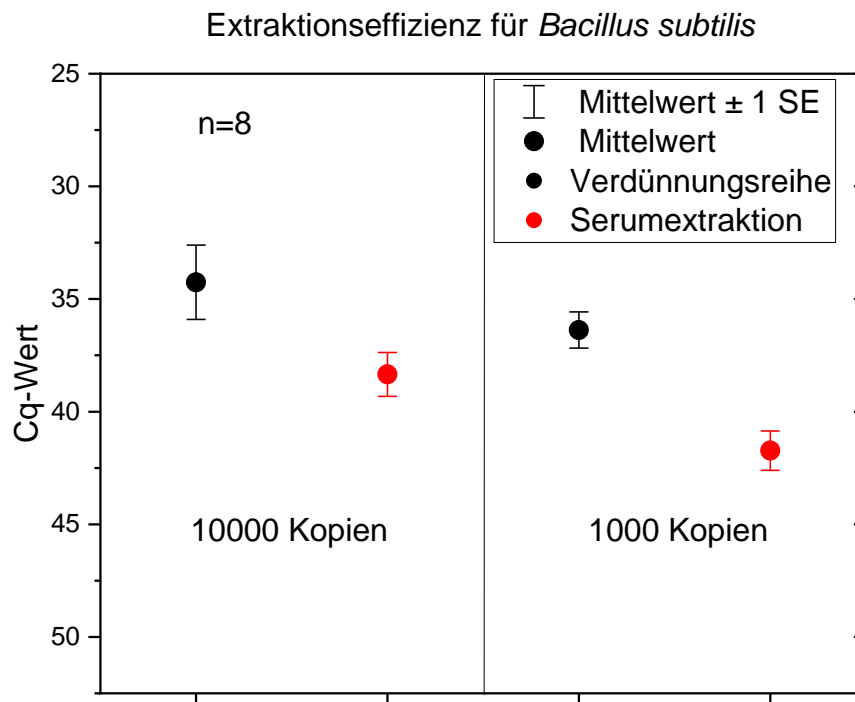


Abbildung 8. Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung aus Humanserum mit *Bacillus subtilis*. Alle hier dargestellten Versuche wurden mit GEX-Mastermix durchgeführt. Die PCR wurde mit 55 Zyklen durchgeführt.

### 3.3.2 Vergleich der Ergebnisse von GEX-Mastermix und Sso-Mastermix in der Real-Time PCR

Nachdem mit den neueren GEX-Chargen (Charge 1110130) keine zufrieden stellenden Ergebnisse erreicht werden konnten, wurden die Versuche noch einmal mit dem Sso-Mix im gleichen Versuchsaufbau wie unter 3.3.1.1.-3.3.1.4 beschrieben durchgeführt. Alle Versuche wurden im Monoplexformat durchgeführt (siehe Tabelle 1 und 2). Es wurden nacheinander die Proben mit GEX- und mit Sso-Mastermix getestet und verglichen.

### 3.3.2.1 Vergleich zwischen GEX-Mastermix und Sso-Mastermix für *Aspergillus fumigatus* im Monoplexformat in wässriger Lösung

Zunächst wurden wieder Verdünnungsreihen angesetzt. Es wurden im selben Versuchsaufbau GEX- und Sso-Mastermix getestet, um einen direkten Vergleich zu bekommen. Hierzu wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt.

Im Mittel waren die Cq-Werte im GEX-Mastermix bei 30,8 Zyklen mit  $10^4$  Kopien *Aspergillus fumigatus*. Im Vergleich dazu war beim Sso-Mastermix der Cq-Wert bei 25,3 Zyklen im Mittel. Bei  $10^3$  Kopien war der Cq-Wert von GEX-Mastermix bei 34,1 Zyklen und bei Sso-Mastermix im Mittel bei 30,5 Zyklen. Zusätzlich kam es auch bei 9 von 24 Proben zu einzelnen Ausreißern im GEX-Mastermix, die aber in der Abbildung 9 nicht dargestellt sind, da die Cq-Werte sich oberhalb von 50 Zyklen befanden. In beiden Versuchen war der Cq-Wert im Sso-Mastermix deutlich geringer als im GEX-Mastermix.

Direkter Vergleich von Sso- und GEX-Mastermix in wässriger Lösung für *Aspergillus fumigatus*

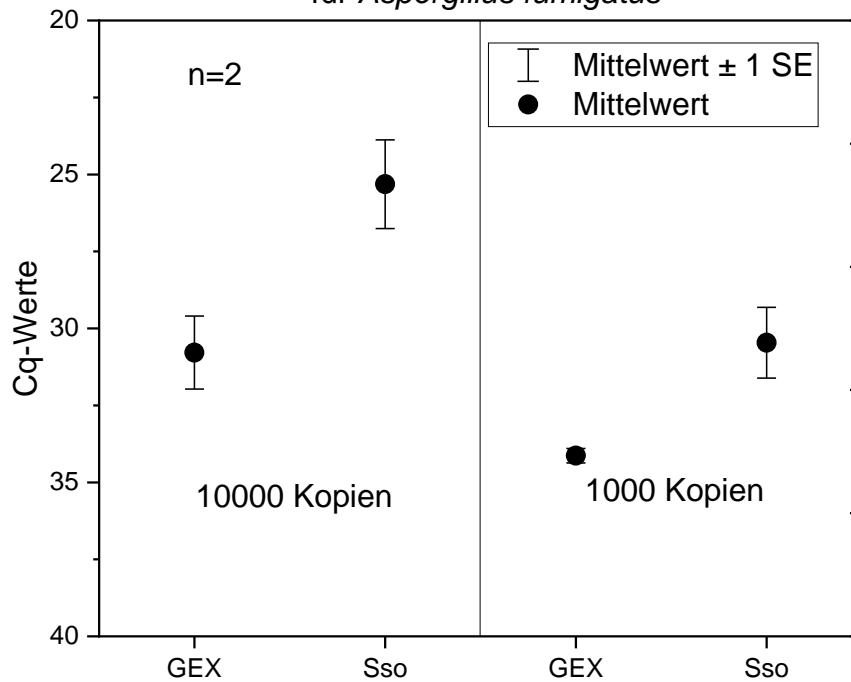


Abbildung 9. Unterschiede zwischen den Cq-Werten von *Aspergillus fumigatus* in Sso- versus GEX-Mastermix. Alle hier dargestellten Versuche wurden in wässriger Lösung durchgeführt. Es wurden je 3 Replikate pro Versuch getestet.

3.3.2.2 Vergleich zwischen GEX-Mastermix und Sso-Mastermix für *Bacillus subtilis* im Monoplexformat in wässriger Lösung

In zwei Versuchsläufen wurden nacheinander Verdünnungen von *Bacillus subtilis* mit GEX- und dann mit Sso-Mastermix getestet.

Der Cq-Wert für  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* im Sso-Mastermix war im Mittel bei 25,9 Zyklen. Im Vergleich dazu wurde im GEX-Mastermix nur ein Cq-Mittelwert von 31,3 Zyklen erreicht. Ähnlich war es bei  $10^3$  Kopien. Im GEX-Mastermix wurde im Mittel ein Cq-Wert von 35,8 Zyklen erreicht und im Sso-Mastermix von 30,7 Zyklen.

Ähnlich wie bei *Aspergillus fumigatus*, schwankten die Cq-Werte leicht bei gleicher Kopienanzahl. Die Cq-Werte beim Sso-Mastermix waren im Mittel deutlich geringer als im GEX-Mastermix. Auch die Stabilität war im Sso-Mastermix höher als im GEX-Mastermix der neueren Chargen (Charge 1110130), weswegen in den folgenden Versuchen auf den Sso-Mastermix umgestellt wurde. Nachteil des Sso-Mastermix war, dass auch bei allen Negativkontrollen ein Signal für *Bacillus subtilis* gemessen wurde. Dieses lag bei Negativkontrollen zwischen Cq-Werten von 36 und 40 Zyklen.

Direkter Vergleich von Sso- und GEX-Mastermix in wässriger Lösung für *Bacillus subtilis*

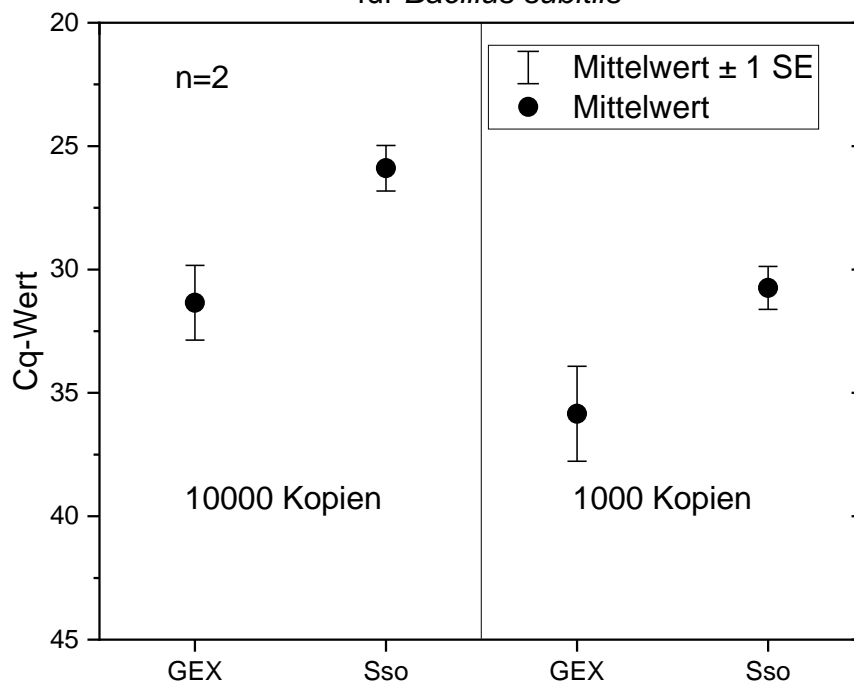


Abbildung 10. Unterschiede zwischen den Cq-Werten von Sso- versus GEX-Mastermix bei *Bacillus subtilis*. Alle hier dargestellten Versuche wurden in wässriger Lösung durchgeführt. Es wurden je 3 Replikate pro Versuch getestet.

### 3.3.2.3 Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von *Aspergillus fumigatus* und Vergleich der Ergebnisse mit Sso- und GEX-Mastermix

Wie schon bei den Versuchen zuvor wurden hier Serumproben mit *Aspergillus fumigatus*-DNA versetzt und danach aufbereitet. Die aufbereiteten Proben wurden zusammen mit den entsprechenden DNA-Verdünnungen getestet und verglichen (exemplarischer Versuchsaufbau siehe Abbildung 5). In die Proben wurden aus den vorher getesteten Verdünnungsreihen  $10^4$  Kopien und  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA eingebracht. Nach der Extraktion und Real-Time PCR-Analyse wurde nun Sso- mit GEX-Mastermix verglichen. Die Extraktionseffizienz wurde wie in 3.3.1.2 sowohl im GEX-Mastermix als auch im Sso-Mastermix getestet.

Der Cq-Wert für Sso war bei  $10^4$  Kopien bei 30,1 Zyklen im ersten Eluat und bei 34,4 Zyklen im zweiten Eluat. Zum Vergleich war im GEX-Mastermix bei gleicher Kopienzahl der Cq-Wert im Mittel bei 37,7 Zyklen im ersten Eluat und bei 42,1 Zyklen im zweiten Eluat. Damit lieferte der Sso-Mastermix um 7,7 Zyklen niedrigere Werte als der GEX-Mastermix. Bei  $10^3$  Kopien wurde mit dem Sso-Mastermix ein Cq-Wert von 33,5 Zyklen im ersten Eluat erreicht und von 38,0 Zyklen im zweiten Eluat. Mit dem GEX-Mastermix wurde im ersten Eluat ein Cq-Wert im Mittel von 43,2 Zyklen erzielt und im zweiten Eluat von 40,1 Zyklen. Auch hier war der Sso-Mastermix dem GEX-Mastermix um 5,9 Zyklen überlegen.

Als Ergebnis dieser Versuche zeigten sich, wie bei den Versuchen mit wässriger Lösung deutlich niedrigere Cq-Werte im Sso-Mastermix verglichen mit denen des GEX-Mastermixes. Beim GEX-Mastermix wurde nach Serumextraktion mit  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* wiederholt ein niedrigerer Cq-Wert im zweiten Eluat erzielt als im ersten. Ob dies mit der GEX-Charge (Charge 1110130) zusammenhängt, kann auf Grund von Cq-Wert-Instabilitäten nicht belegt werden. Dieses Phänomen trat beim Sso-Mastermix nicht auf. Auch die Cq-Werte schienen im Sso-Mastermix stabiler zu sein, da es bei den

Versuchen mit Sso-Mastermix zu keinen Ausreißern oder falsch negativen Ergebnissen bei einzelnen Proben kam.

Direkter Vergleich der Eluate aus der Serumextraktion von *Aspergillus fumigatus* zwischen GEX-Mastermix und Sso-Mastermix

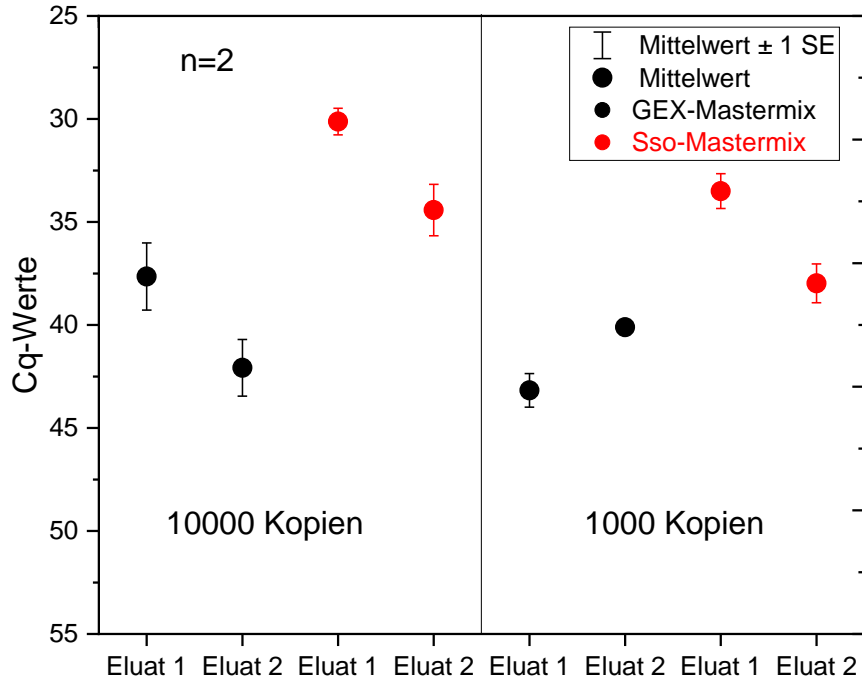


Abbildung 11. Vergleich der Cq-Werte mit extrahierter *Aspergillus fumigatus*-DNA im Sso- versus GEX-Mastermix. Es wurden je 2 Eluate á 35µl Elutionsvolumen getestet. Es wurden je 3 Replikate pro Eluat getestet.

### 3.3.2.4 Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von *Bacillus subtilis* und Vergleich der Ergebnisse im Sso- und GEX-Mastermix

Im gleichen Versuchslauf wurde *Bacillus subtilis* getestet. Wie bei *Aspergillus fumigatus* wurden die Humanserumproben mit  $10^4$  und  $10^3$  Kopien versetzt und danach aufbereitet.

Bei  $10^4$  Kopien war der Cq-Wert im Sso-Mastermix bei 33,4 Zyklen im ersten Eluat und bei 33,9 Zyklen im zweiten Eluat. Im GEX-Mastermix wurde ein Cq-Wert im Mittel von

40,3 Zyklen im ersten und von 39,5 Zyklen im zweiten Eluat erzielt. Damit war der Cq-Wert bei Sso-Mastermix im Schnitt um 6,3 Zyklen niedriger als bei GEX-Mastermix. Bei  $10^3$  Kopien war der Cq-Wert im Sso-Mastermix bei 34,0 Zyklen im ersten und bei 34,8 Zyklen im zweiten Eluat. Beim GEX-Mastermix lag der Cq-Wert im Mittel bei 43,6 Zyklen im ersten, und bei 40,9 Zyklen im zweiten Eluat und damit um 7,9 Zyklen höher als im Sso-Mastermix.

Das Ergebnis war ähnlich wie bei den Versuchen mit DNA von *Aspergillus fumigatus*. Die Cq-Werte waren im Sso-Mastermix niedriger als im GEX-Mastermix. Auch hier konnte beobachtet werden, dass bei allen Proben mit GEX-Mastermix im zweiten Eluat ein niedrigerer Cq-Wert erreicht wurde als im ersten. Dies war jedoch im dargestellten Versuch mit Sso-Mastermix nicht der Fall (Abbildung 12). Bei den Ergebnissen für *Bacillus subtilis* muss beachtet werden, dass die Negativkontrollen immer mit Cq-Werten zwischen 36-40 Zyklen positiv waren. Da die Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* deutlich stabiler waren und zu diesem Zeitpunkt kein brauchbarer Ersatz für den GEX-Mastermix gefunden werden konnte, wurden nachfolgende Versuche komplett auf Sso-Mastermix umgestellt.

Direkter Vergleich der Eluate aus der Serumextraktion von *Bacillus subtilis* zwischen GEX-Mastermix und Sso-Mastermix

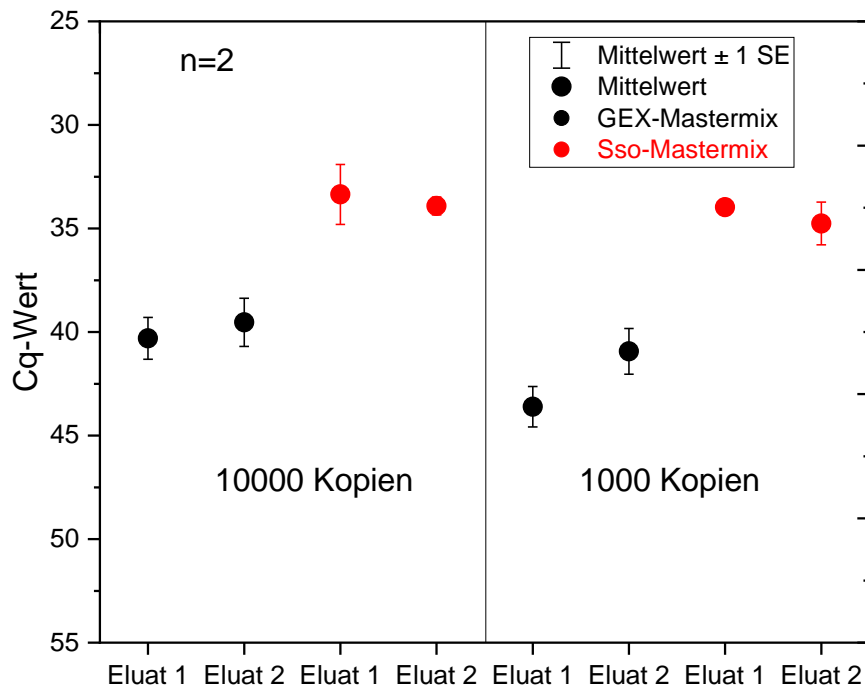


Abbildung 12. Vergleich der Cq-Werte extrahierter *Bacillus subtilis*-DNA in Sso- versus GEX-Mastermix. Es wurden je 2 Eluate mit á 35µl Elutionsvolumen getestet.

### 3.3.3 Extraktionseffizienz und Vergleich der Eluate im Monoplexformat mit Sso-Mastermix

Es wurde der gleiche Versuchsaufbau wie zuvor bei den Versuchen im Monoplexformat mit GEX-Mastermix durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.1.2). Ebenso wurde ein Faktor generiert, um den Verlust an DNA während der Aufbereitung zu verdeutlichen.



### 3.3.3.1 Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung von Humanserumproben mit *Aspergillus fumigatus* mit Sso-Mastermix

Wie bei den Versuchen unter 3.3.1.2 wurden neue Verdünnungsreihen erstellt. Alle Versuche wurden direkt nach den Testergebnissen der Verdünnungsreihen gestartet, um eine mögliche Zersetzung durch DNAsen zu vermeiden. Wie schon in den Versuchen unter 3.3.1.2 zuvor wurden  $10^4$  Kopien und  $10^3$  Kopien in die Serumproben eingegeben.

Der Verlust an DNA während der Aufbereitung der Proben mit  $10^4$  Kopien *Aspergillus fumigatus* lag im Mittel bei 4,8 Zyklen. Der Cq-Wert für  $10^4$  Kopien in wässriger Lösung war bei 25,3 Zyklen, während nach Serumextraktion ein Cq-Wert im Mittel von 30,1 Zyklen erzielt wurde. Für  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* war der Verlust an DNA während der Aufbereitung im Mittel bei einem Faktor von 3,9. Der Cq-Wert mit  $10^3$  Kopien lag bei 30,5 Zyklen im Mittel in wässriger Lösung und nach Extraktion bei 34,3 Zyklen (Abbildung 13). Die wässrigen Negativkontrollen und die negativen Extraktionskontrollen wurden bei allen Versuchen negativ getestet. Die getesteten Verdünnungsreihen waren im Hinblick auf die Cq-Werte stabil.

### Extraktionseffizienz im Sso-Mastermix für *Aspergillus fumigatus*

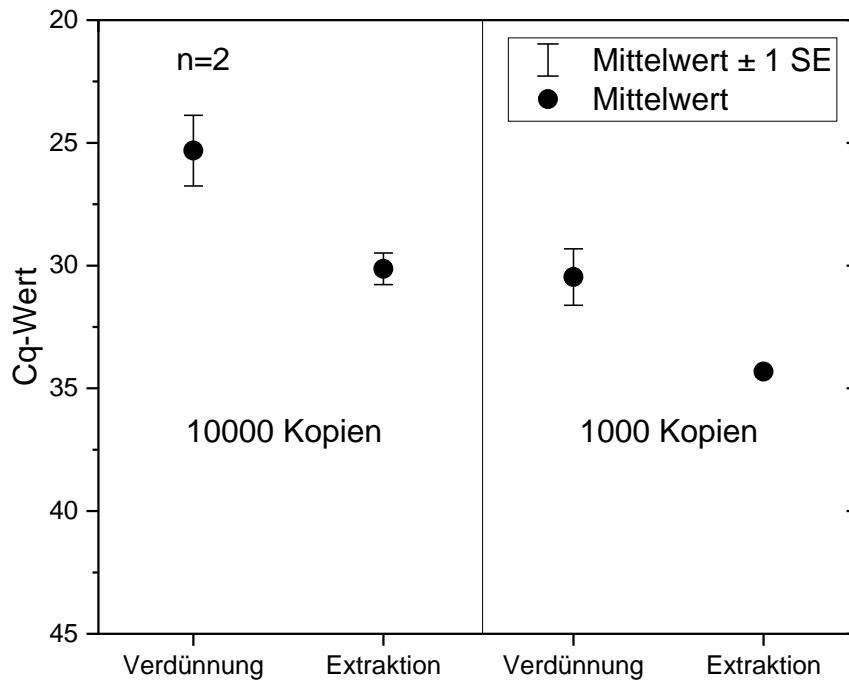


Abbildung 13. Extraktionseffizienz von *Aspergillus fumigatus*-DNA im Sso-Mastermix im Monoplexformat. Verdünnung wurde in wässriger Lösung angefertigt. Elutionsvolumen war 35 $\mu$ l. Es wurden immer Triplikate getestet.

#### 3.3.3.2 Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung von Humanserumproben mit *Bacillus subtilis* mit Sso-Mastermix

Wie bei den Versuchen mit *Aspergillus fumigatus* wurden immer neue Verdünnungsreihen erstellt, anschließend auf Konsistenz getestet und in diversen Verdünnungen in die Humanserumproben eingegeben. Nach Aufbereitung wurden die Testergebnisse der Serumextraktion mit den Testergebnissen der Verdünnungsreihen verglichen. Um die Testergebnisse zu evaluieren, wurde ein Faktor generiert, der sich aus Cq-Wert der Verdünnungsreihe minus Cq-Wert der aufbereiteten Serumprobe errechnet. Bei  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA wurde in wässriger Lösung ein Cq-Wert im Mittel von 25,9 Zyklen erreicht. In der Serumextraktion wurde ein Cq-Wert von 33,4 Zyklen erzielt. Bei

$10^3$  Kopien war der Cq-Wert im Mittel bei 30,7 Zyklen und nach der Serumextraktion bei 34,0 Zyklen. Dies entspricht bei  $10^4$  Kopien einem Faktor von 7,5 und bei  $10^3$  Kopien einem Faktor von 3,3 (Abbildung 14).

Die Ergebnisse für *Bacillus subtilis* waren wie bei *Aspergillus fumigatus* in Bezug auf die Cq-Werte stabil. Der DNA-Verlust bei der Aufbereitung war sehr variabel. Mögliche Gründe hierfür könnten untersucherbedingte Fehler bei der Aufbereitung der Proben sein. Auch die Zersetzung durch eine DNase, die nach oder während der DNA-Aufbereitung DNA zersetzt, wie es auch bei den Verdünnungen mit niedrigerer Kopien-Anzahl ab ca.  $10^3$  Kopien in wässriger Lösung der Fall war, kann eine mögliche Erklärung darstellen.

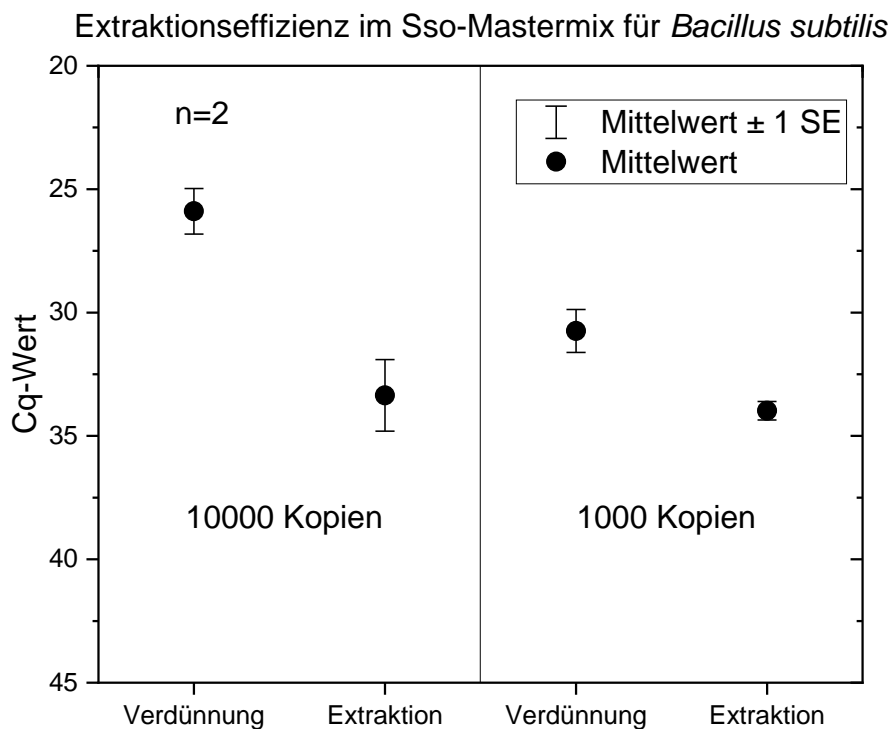


Abbildung 14. Extraktionseffizienz von *Bacillus subtilis*-DNA im Sso-Mastermix im Monoplexformat. Verdünnung wurde in wässriger Lösung angefertigt. Elutionsvolumen war 35µl. Es wurden immer Triplikate getestet.

### 3.4 Versuche im Duplexformat

Bei diesen Versuchen war das Ziel, *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* zusammen in einer Probe nachzuweisen. So sollten Extraktion und Qualität der *Aspergillus fumigatus*-DNA überprüft werden. Der Gedanke dahinter ist, dass *Bacillus subtilis* in immer gleicher Kopienanzahl zu den Serumproben hinzugegeben wird, um so eine Kontrolle über den Extraktionsprozess zu erhalten. So könnte man mit *Bacillus subtilis* auch eine Aussage über die Extraktionseffizienz machen.

Wie zuvor bei den Versuchen im Monoplexformat wurden die Verdünnungsreihen am Versuchstag neu erstellt. Diese wurden dann, unmittelbar nachdem sie getestet waren, in die Proben eingegeben. Alle Versuche wurden in wässriger Lösung durchgeführt.

#### 3.4.1 Vergleich von Experimenten im Monoplex- versus Duplexformat mit Sso-Mastermix

Mit diesen Versuchen sollten mehrere Fragen geklärt werden.

1. Gibt es einen generellen Unterschied der C<sub>q</sub>-Werte von *Aspergillus fumigatus* zwischen Versuchen im Monoplexformat und Duplexformat?
2. Gibt es Unterschiede bei den C<sub>q</sub>-Werten, wenn man zusätzlich *Bacillus subtilis*-DNA in die Proben einbringt?
3. Gibt es einen Einfluss auf den C<sub>q</sub>-Wert, wenn man die Anzahl der *Bacillus subtilis*-DNA-Kopien variiert?
4. Wie stark ist der Einfluss auf die C<sub>q</sub>-Werte bei sehr niedriger Kopienzahl von *Aspergillus fumigatus*-DNA?

5. Gibt es einen Einfluss auf die Cq-Werte von *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit von der Konzentration an *Aspergillus fumigatus*-DNA im Duplexversuch?

#### 3.4.1.1 Unterschied der Cq-Werte von *Aspergillus fumigatus* im Monoplex- zu Duplexformat mit Sso-Mastermix ohne *Bacillus subtilis*-DNA

Hier wurde eine Verdünnungsreihe mit *Aspergillus fumigatus* angelegt und vor Versuchsbeginn getestet. Es wurden dann zwei unterschiedliche Ansätze des Mastermixes erstellt, ein Monoplex- und ein Duplexformat (Mastermixzusammensetzung siehe Tabelle 2 (Monoplexformat) und Tabelle 3 (Duplexformat)). In diesen beiden Ansätzen wurde keine *Bacillus subtilis*-DNA zugemischt. Es wurden lediglich Primer und Sonden von *Bacillus subtilis* im Duplexformat zugegeben. Nun wurden Verdünnungen von  $10^3$  Kopien,  $10^2$  Kopien und 10 Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA getestet.

Für  $10^3$  Kopien ergab sich im Monoplex-Mastermix im Mittel ein Cq-Wert von 29,8 Zyklen, im Duplex-Mastermix ein Cq-Wert von 29,3 Zyklen. Bei  $10^2$  Kopien wurde ein Cq-Wert im Monoplex-Mastermix im Mittel von 34,3 Zyklen und im Duplex-Mastermix von 33,2 Zyklen erzielt. Bei 10 Kopien kam es zu mehreren nicht detektierten Proben, weshalb eine Aussage über Cq-Werteunterschiede zwischen Monoplex- und Duplexformat nur eingeschränkt möglich ist. Im Monoplex-Mastermix wurde hier im Mittel ein Cq-Wert von 35,4 Zyklen und im Duplex-Mastermix von 37,4 Zyklen gemessen. Es ergab sich kein deutlicher Unterschied der Cq-Werte zwischen Monoplex- und Duplexformat (Abbildung 15).

#### 3.4.1.2 Auswirkung auf die Cq-Werte von *Aspergillus fumigatus*-DNA bei eingebrachter *Bacillus subtilis*-DNA im Sso-Mastermix

Es wurden drei verschiedenen Ansätze von Mastermix im Duplexformat angefertigt (Mastermixzusammensetzung siehe Tabelle 3). Im ersten Ansatz wurde keine *Bacillus*

*subtilis*-DNA beigefügt. Dem zweiten Ansatz wurden  $10^4$  Kopien und dem dritten Ansatz  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA zugesetzt.

<b>Proben</b>	<b>Mastermix ohne <i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>Mastermix mit <i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>Mastermix mit <i>Bacillus subtilis</i></b>
<b>Zusammensetzung Probe 1 (immer Triplikate)</b>	10,75 µl Mastermix	10,75 µl Mastermix	10,75 µl Mastermix
	10 µl mit $10^3$ Kopien <i>Aspergillus fumigatus</i>	10 µl mit $10^3$ Kopien <i>Aspergillus fumigatus</i>	10 µl mit $10^3$ Kopien <i>Aspergillus fumigatus</i>
		1 µl mit $10^4$ Kopien <i>Bacillus subtilis</i>	1 µl mit $10^5$ Kopien <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Zusammensetzung Probe 2 (immer Triplikate)</b>	10,75 µl Mastermix	10,75 µl Mastermix	10,75 µl Mastermix
	10 µl mit $10^2$ Kopien <i>Aspergillus fumigatus</i>	10 µl mit $10^2$ Kopien <i>Aspergillus fumigatus</i>	10 µl mit $10^2$ Kopien <i>Aspergillus fumigatus</i>
		1 µl mit $10^4$ Kopien <i>Bacillus subtilis</i>	1 µl mit $10^5$ Kopien <i>Bacillus subtilis</i>
<b>Zusammensetzung Probe 3 (immer Triplikate)</b>	10,75 µl Mastermix	10,75 µl Mastermix	10,75 µl Mastermix
	10 µl mit 10 Kopien <i>Aspergillus fumigatus</i>	10 µl mit 10 Kopien <i>Aspergillus fumigatus</i>	10 µl mit 10 Kopien <i>Aspergillus fumigatus</i>
		1 µl mit $10^4$ Kopien <i>Bacillus subtilis</i>	1 µl mit $10^5$ Kopien <i>Bacillus subtilis</i>

Tabelle 13. Schematische Darstellung der Proben für die Real-time-PCR im Duplexformat.

Im Duplexmastermix ohne *Bacillus subtilis*-DNA wurde bei  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* ein Cq-Mittelwert von 29,8 Zyklen erzielt. Mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA betrug der Cq-Wert im Mittel 29,2 Zyklen und mit  $10^5$  Kopien 29,5 Zyklen. Bei dieser Menge von *Aspergillus fumigatus*-DNA hatte die *Bacillus subtilis*-DNA-Menge bis  $10^5$  Kopien keinen Einfluss. Für  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA wurde ein Mittelwert von 33,2 Zyklen erreicht, der Cq-Mittelwert mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA betrug 32,9 Zyklen und mit  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA 32,8 Zyklen. Auch bei dieser *Aspergillus fumigatus*-DNA-Menge gab es keinen Einfluss der *Bacillus subtilis*-DNA auf die Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus*. Bei 10 Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA kam es zu einigen nicht detektierten Proben. Im Mittel konnte ein Cq-Wert von 37,9 Zyklen im Mastermix im Duplexformat ohne *Bacillus subtilis*-DNA gemessen werden. Der Cq-Wert mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA war bei 41,7 Zyklen und mit  $10^5$  Kopien bei 45,5 Zyklen. Wie in Abbildung 15 dargestellt, gab es bei niedrigen Konzentrationen an *Aspergillus fumigatus*-DNA und hohen Konzentrationen an *Bacillus subtilis*-DNA einen deutlichen Einfluss auf den Nachweis von *Aspergillus fumigatus*. Bei 10 Kopien kam es zur Instabilität der Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* im Monoplexformat und im Duplexformat, diese zeigte sich in diesen Versuchen bei allen Mastermixansätzen. Es war zu beobachten, dass sich die Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* mit steigenden *Bacillus subtilis*-DNA-Kopien Konzentration bei  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* um 6,7 Zyklen und bei  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis* um 10,1 Zyklen nach oben verschoben haben. Es kam in diesen Versuchen zwar nicht mehr zum Ausfall einzelner Proben, aber die Cq-Werte wurden bei niedriger Konzentration von *Aspergillus fumigatus*-DNA deutlich negativ beeinflusst (Abbildung 15). Ein großer Nachteil des Sso-Mastermixes besteht jedoch darin, dass die Negativkontrollen für *Bacillus subtilis* in diesen Versuchen mit 36-40 Zyklen, wie schon bei den Versuchen im Monoplexformat zuvor, ein Signal zeigen (Abbildung 17).

Vergleich von Monoplex- und Duplexformat mit *Aspergillus fumigatus* im Sso-Mastermix

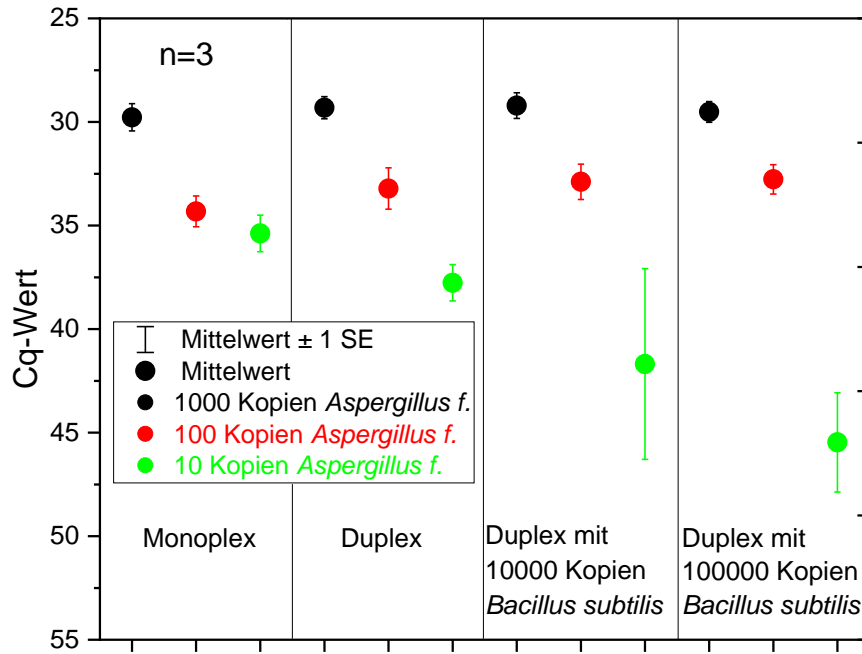


Abbildung 15. Vergleich von Monoplex- versus Duplexformat im Sso-Mastermix mit und ohne *Bacillus subtilis*-DNA in verschiedenen Konzentrationen. *Bacillus subtilis*-DNA wurde direkt in die Mastermix-Ansätze eingegeben. Es wurden pro Ansatz immer Triplikate getestet.



### 3.4.2 Vergleich von Experimenten im Monoplex- versus Duplexformat mit GEX-Mastermix

Es konnten wieder brauchbare Chargen an GEX-Mastermix beschafft werden. Deshalb wurden die Versuche wie unter 3.4.1.1 und 3.4.1.2 in der gleichen Versuchsanordnung wie beim Sso-Duplexmastermix wiederholt und miteinander verglichen.

#### 3.4.2.1 Unterschied der C<sub>q</sub>-Werte von *Aspergillus fumigatus* im Monoplex- zu Duplexformat mit GEX-Mastermix ohne *Bacillus subtilis*-DNA

Wie unter 3.4.1.1 wurden hier Monoplex- und Duplexformat verglichen. Hierzu wurden drei Versuche durchgeführt.

Im Monoplexformat wurde für  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* ein C<sub>q</sub>-Wert im Mittel von 32,7 Zyklen erreicht. Erstaunlicherweise wurde im Duplexformat ohne *Bacillus subtilis*-DNA ein C<sub>q</sub>-Wert im Mittel von 30,1 Zyklen gemessen. Bei  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* war der C<sub>q</sub>-Wert im Monoplexformat bei 36,2 Zyklen und im Duplexformat bei 35,2 Zyklen. Bei 10 Kopien wurde ein C<sub>q</sub>-Wert im Monoplexformat von 40,7 Zyklen erzielt und im Duplexmastermix von 39,8 Zyklen (Abbildung 16). Wie beim Sso-Mastermix ergaben sich hier keine deutlichen Unterschiede der C<sub>q</sub>-Werte. Da die C<sub>q</sub>-Werte bei allen Duplexmastermix-Ansätzen niedriger waren, ist davon auszugehen, dass es einen Einfluss von *Bacillus subtilis*-Primer und Sonden auf die C<sub>q</sub>-Werte von *Aspergillus fumigatus* gibt. Dieser Einfluss scheint sich aber positiv auf die Sensitivität auszuwirken, da sich alle gemessenen C<sub>q</sub>-Werte im Duplexmastermix verringerten. Die Negativkontrollen waren bei allen durchgeführten Versuchen negativ.

### 3.4.2.2 Auswirkung auf die Cq-Werte von *Aspergillus fumigatus*-DNA bei eingebrachter *Bacillus subtilis*-DNA im GEX-Mastermix

Die Versuchsanordnung war genauso wie unter 3.4.1.2. dargestellt aufgebaut.

Bei einer *Aspergillus fumigatus*-DNA-Konzentration von  $10^3$  Kopien waren die Cq-Werte im Mastermix im Duplexformat ohne *Bacillus subtilis* bei 30,1 Zyklen. Mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA im Duplexformat und  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* wurde ein Cq-Wert im Mittel von 30,7 Zyklen erreicht und mit  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis* ein Cq-Wert von 31,5 Zyklen.

Im Duplexformat wurde bei  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA im Mittelwert ein Cq-Wert von 35,2 Zyklen gemessen. Die Cq-Werte im Duplexmastermix mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* waren im Mittel bei 34,4 Zyklen und bei  $10^5$  Kopien deutlich niedriger bei 42,9 Zyklen.

Bei 10 Kopien *Aspergillus fumigatus* wurde im Duplexformat ohne *Bacillus subtilis* ein Mittelwert von 40,7 Zyklen gemessen. Im Duplexmastermix mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* wurde ein deutlich niedrigerer Cq-Mittelwert von 46,5 Zyklen und bei  $10^5$  Kopien ein Cq-Wert im Mittel von 51,3 Zyklen gemessen. Auf Grund der niedrigen Kopienanzahl von *Aspergillus fumigatus* kam es zu Instabilitäten.

Es zeigte sich bei diesen Versuchen, dass *Bacillus subtilis* mit steigender DNA-Konzentration in Kombination mit niedrigen Mengen von *Aspergillus fumigatus* (ab  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA) einen deutlichen Einfluss auf die Cq-Werte von *Aspergillus fumigatus* hat (Abbildung 16). Die Menge an *Bacillus subtilis*-DNA pro Probe hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Cq-Werte. Bei  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* war der Unterschied in den Cq-Werten bei 8,5 Zyklen zwischen eingegebenen  $10^4$  Kopien und  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA. Bei  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA war der Unterschied im Duplexformat ohne *Bacillus subtilis*-DNA und dem Duplexformat mit eingegebenen  $10^4$  Kopien bei 6,7 Zyklen. Mit  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA lag der Unterschied im Mittel bei 11,5 Zyklen. Da es bei dieser geringen Anzahl an genomischer *Aspergillus fumigatus*-DNA aber regelhaft zu Instabilitäten kommt, kann hier nur eine eingeschränkte Aussage über den tatsächlichen Einfluss getroffen werden. Es war aber zu beobachten, dass sich die mittleren Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* bei niedrigen Kopienzahlen und mittleren Mengen an *Bacillus subtilis* deutlich erhöhen.

Vergleich von Monoplex- und Duplexformat mit *Aspergillus fumigatus* im GEX-Mastermix

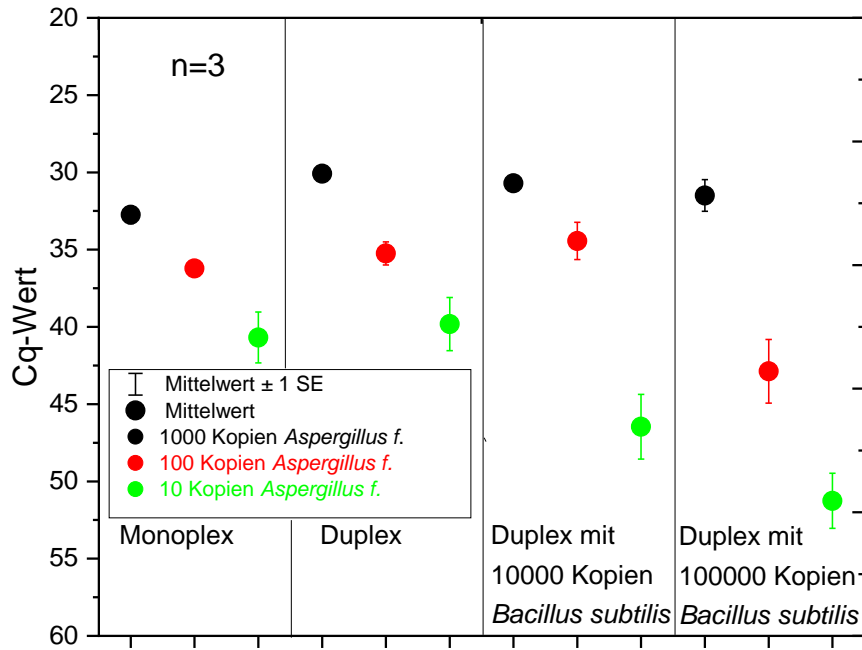


Abbildung 16. Vergleich von Monoplex- versus Duplexformat im GEX-Mastermix, mit und ohne *Bacillus subtilis*-DNA in verschiedenen Konzentrationen. *Bacillus subtilis*-DNA wurde direkt in die Mastermix-Ansätze eingegeben. Es wurden pro Ansatz immer 3 Replikate getestet.

### 3.4.3 Vergleich der Cq-Werte zwischen Sso- und neuen Chargen von GEX-Mastermix

Vergleicht man die beiden o.g. Diagramme (Abbildung 15 und 16) zeigt sich, dass sich die Cq-Werte zwischen Sso- und GEX-Mastermix deutlich unterscheiden. Der Cq-Wert des Sso-Mastermix im Monoplexformat mit  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* war 2,9 Zyklen niedriger als der Cq-Wert vom GEX-Mastermix bei gleicher DNA-Konzentration. Im Duplexformat war bei gleicher *Aspergillus fumigatus*-DNA-Konzentration der Sso-Mastermix um 0,8 Zyklen niedriger als im GEX-Mastermix. Beim Duplexformat mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* war der Cq-Wert des Sso-Mastermix um 1,5 Zyklen und bei  $10^5$  Kopien um zwei Zyklen niedriger als im GEX-Mastermix.

Im Monoplexformat war der Cq-Wert des GEX-Mastermixes mit  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* um 1,9 Zyklen niedriger als im Sso-Mastermix, der im Mittel einen Cq-Wert von 34,3 Zyklen erzielte. Im Duplex-Mastermix war der Cq-Wert für  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA bei 33,2 Zyklen und damit zwei Zyklen niedriger als der Cq-Wert im GEX-Mastermix. Mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* war der Cq-Wert für *Aspergillus fumigatus* im GEX-Mastermix um 1,5 Zyklen im Mittel höher als im Sso-Mastermix. Bei einer Menge von  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA war der Sso-Mastermix mit einem mittleren Cq-Wert von 32,8 Zyklen bei  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* dem GEX-Mastermix mit 10,1 Zyklen deutlich überlegen. Durch die instabilen Cq-Werte und mehrere nicht detektierte Proben kann bei 10 Kopien *Aspergillus fumigatus* nur ein eingeschränkter Vergleich zwischen Sso- und GEX-Mastermix gemacht werden. Im Monoplexformat betrug der Cq-Wert im Mittel mit 10 Kopien *Aspergillus fumigatus* beim Sso-Mastermix 35,4 Zyklen und war so um 5,3 Zyklen früher zu detektieren als bei gleicher *Aspergillus fumigatus*-DNA-Kopienanzahl im GEX-Mastermix. Im Duplexformat konnte mit dem Sso-Mastermix bei 10 Kopien *Aspergillus fumigatus* ein Cq-Wert im Mittel von 38,0 Zyklen erreicht werden. Dieser war somit um 1,8 Zyklen niedriger als der des GEX-Mastermix. Mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA ergab sich im Sso-Mastermix ein Cq-Wert für *Aspergillus fumigatus* im Mittel von 41,7 Zyklen und im GEX-Mastermix von 46,5 Zyklen bei 10 Kopien *Aspergillus fumigatus*. Bei  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis* wurde im Sso-Mastermix ein Mittelwert von 45,5 Zyklen für 10 Kopien

*Aspergillus fumigatus* erreicht und war damit um 5,8 Zyklen geringer als der Cq-Wert im GEX-Mastermix.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes aussagen:

1. Die Benutzung des Sso-Mastermix führte im Mittel zu einem um 3,5 Zyklen niedrigeren Cq-Wert.
2. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stabilität der Cq-Werte bei niedriger Konzentration an *Aspergillus fumigatus*-DNA. Auch hier war der Sso-Mastermix besser geeignet, da bei verschiedenen GEX-Mastermixen schon Instabilitäten bei  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA auftraten.
3. Die Menge von gleichzeitig eingegebener *Bacillus subtilis*-DNA beim GEX-Mastermix im Gegensatz zum Sso-Mastermix scheint einen größeren Einfluss auf die Testergebnisse für *Aspergillus fumigatus* zu haben.

#### 3.4.4 Einfluss von *Aspergillus fumigatus*-DNA auf die Cq-Werte von *Bacillus subtilis*

Bei den Versuchen im Duplexformat wurden die Cq-Werte für *Bacillus subtilis* ebenfalls detektiert und ausgewertet. Es wurden vier verschiedene Ansätze des Mastermixes im Duplexformat erstellt. In einem Ansatz wurden  $10^4$  Kopien, in einem anderen Ansatz  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA eingegeben. Diese Ansätze wurden mit GEX-Mastermix und mit Sso-Mastermix erstellt. In den mit *Bacillus subtilis*-DNA versetzten Mastermix wurden dann verschiedene Mengen an *Aspergillus fumigatus*-DNA eingegeben. Es wurden  $10^3$ -,  $10^2$ - und 10 Kopien *Aspergillus fumigatus* eingegeben. Für jeden der Ansätze wurden jeweils Triplikate erstellt.

Der mittlere Cq-Wert für *Bacillus subtilis* betrug im Sso-Mastermix mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* und  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* 30,4 Zyklen, bei  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* 33,9 Zyklen und bei 10 Kopien *Aspergillus fumigatus* 37,1 Zyklen.

Erstaunlicherweise haben sich die Cq-Werte für *Bacillus subtilis* erhöht, je niedriger die Menge an *Aspergillus fumigatus*-DNA war. Dieses Phänomen war auch bei  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis* zu beobachten, wenn auch nicht so deutlich. Bei  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* wurde ein mittlerer Cq-Wert für *Bacillus subtilis* von 26,3 Zyklen erzielt, bei  $10^2$  Kopien war der Cq-Wert bei 29,0 Zyklen und bei 10 Kopien bei 29,5 Zyklen.

Damit hat die Menge der *Aspergillus fumigatus*-DNA einen Einfluss auf die Cq-Werte für *Bacillus subtilis*. Warum sich die Cq-Werte bei niedrigen *Aspergillus fumigatus*-Konzentrationen erhöhen, lässt sich anhand dieser Versuchen nicht erklären. Wie schon bekannt wurde im Duplexformat ohne *Bacillus subtilis*-DNA auch immer ein positives Signal für *Bacillus subtilis* detektiert. Bei diesen Versuchen war ein Cq-Wert im Mittel von 38,5 Zyklen bei  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* detektiert worden. Bei  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* war der Cq-Wert im Mittel bei 36,6 Zyklen und bei 10 Kopien bei 36,7 Zyklen. Auch bei den Versuchen ohne eingegebene *Bacillus subtilis*-DNA änderte sich der Cq-Wert für *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit von der Menge an *Aspergillus fumigatus*.

Im Vergleich dazu ergab der GEX-Mastermix bei  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* und  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* einen Mittelwert für *Bacillus subtilis* von 33,0 Zyklen, bei  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* einen mittleren Cq-Wert von 33,9 Zyklen und bei 10 Kopien einen Cq-Wert von 32,9 Zyklen. Bei  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis* wurde mit  $10^3$  Kopien *Aspergillus fumigatus* ein mittlerer Cq-Wert von 29,4 Zyklen detektiert, für  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* ein Cq-Wert von 29,0 Zyklen und für 10 Kopien ein Cq-Wert von 28,7 Zyklen. Im Gegensatz zum Sso-Mastermix gab es bei dieser DNA-Konzentration von *Bacillus subtilis* keinen negativen Einfluss auf die Cq-Werte (Abbildung 17).

Vergleich der Cq-Werte von *Bacillus subtilis* im Duplexformat

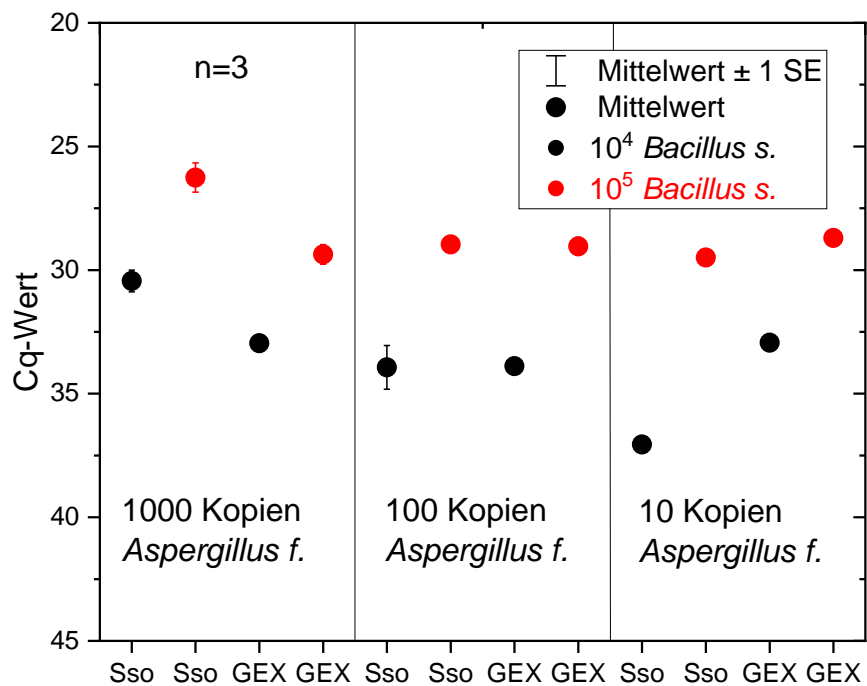


Abbildung 17. Einfluss auf die Cq-Werte von *Bacillus subtilis* bei diversen DNA-Konzentrationen von *Aspergillus fumigatus* im Duplexformat bei Sso- versus GEX-Mastermix. Es wurden immer 3 Replikate getestet.



## 4. Diskussion

Die Diagnostik einer invasiven Aspergillose über Blutbestandteile des Patienten wäre ideal, da eine Blutprobe jederzeit und leicht verfügbar ist und in den meisten Fällen sowieso routinemäßig untersucht wird [27, 28]. Allerdings sind DNA-Fragmente von *Aspergillus fumigatus* im Blut nur in einer sehr geringen Mengen vorhanden, was eine exakte Diagnostik unter Umständen erschwert [29]. Es konnten DNA-Fragmente von *Aspergillus fumigatus* in allen Blutbestandteilen nachgewiesen werden [30]. Der genaue Infektionsfokus der *Aspergillus fumigatus* Infektion kann nicht eruiert werden, es sei denn, *Aspergillus fumigatus* wächst im Blut. Bislang ist es nur möglich, DNA-Bestandteile im Blut zu detektieren, welche wahrscheinlich als Nebenprodukt der zellulären Abwehr, zum Beispiel bei der Phagozytose, zustande kommen [26, 31] In einer Studie von Morton et al. wurde nachgewiesen, dass zellfreie *Aspergillus fumigatus*-DNA auch beim aktiv wachsenden Myzel ins Blut freigesetzt werden kann [32]. Da die zelluläre Abwehr längst beginnt, bevor sich überhaupt Symptome der invasiven Aspergillose zeigen, wäre die valide Diagnostik aus menschlichem Blut erstrebenswert, um Infektionen möglichst frühzeitig zu erkennen. Bis heute ist noch kein standardisiertes PCR-Verfahren zur Detektion von *Aspergillus fumigatus* aus Blut oder Serum etabliert, weshalb die PCR-Detektion von *Aspergillus fumigatus* aus Blutbestandteilen noch kein Diagnose-Kriterium bei der „European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infections Disease Mycoses Study Group“, kurz EORTC/MSG, ist. In mehreren Studien konnten aber bereits eine Verbesserung der Qualität und eine Beschleunigung der Diagnosefindung einer invasiven Aspergillose durch PCR-Detektion von *Aspergillus fumigatus*-DNA bewiesen werden [21].

Der Idee zu dieser Arbeit liegt die Annahme zugrunde, dass sich nach dem Zentrifugieren nicht nur im entstandenen Blutpellet DNA-Fragmente von *Aspergillus fumigatus* befinden, sondern auch noch frei schwimmend im Humanserum. Ein Ziel war es, eine Extraktionskontrolle direkt in jeder Probe zu etablieren. Diese Extraktionskontrolle sollte mit

dem Laborkeim *Bacillus subtilis* erfolgen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Optimierung des PCR-Mastermixes auf die Detektion im Humanserum. Da es bis heute kein standardisiertes Verfahren für die Real-Time PCR in der Diagnostik für die invasive Aspergillose gibt [15], stellt der Mastermix einen elementaren Teil in der Standardisierung dar.

#### 4.1 Optimierung des Mastermixes

Die Vorlage für den Mastermix wurde aus Versuchen mit Vollblut entnommen, die von J. Springer *et al.* 2011 publiziert [18] und auf die Anforderung des Humanserums optimiert wurden. Es sollte ein möglichst geringes Volumen des Mastermixes in jeder Probe enthalten sein. Das Ziel war, hier 10 µl Mastermix pro Probe nicht oder nur gering zu überschreiten. So sollten mögliche Verdünnungseffekte, wie sie bei den Versuchen mit Primer- und Sonden-Verdünnungen aufgetreten waren, vermieden werden. In den Versuchen, in denen 15000 Kopien DNA von *Bacillus subtilis* eingegeben wurden und in denen sich zusätzlich *Aspergillus fumigatus*-Primer und -Sonden im Mastermix befanden, ergaben sich nur geringfügige Änderungen der C<sub>q</sub>-Werte für *Bacillus subtilis*, die sich aber am ehesten durch einen Verdünnungseffekt der Probe, der sich durch das zusätzliche Volumen (1 µl) ergab, erklären lassen. Da sich keine Instabilitäten im Sinne von Ausreißern nach oben oder unten ergaben und die C<sub>q</sub>-Werte nur geringfügig höher wurden, was sich auch durch Versuchswiederholungen replizieren ließ, liegt ein Verdünnungseffekt nahe. Zu bedenken ist aber, dass eine sehr hohe Kopienanzahl an *Bacillus subtilis*-DNA in den Proben enthalten war, bei denen immer stabile C<sub>q</sub>-Werte gemessen werden konnten. Das Volumen des Mastermixes konnte durch eine Verdoppelung des Primer- und Sonden-Stocks von *Bacillus subtilis* reduziert und so auch der Verdünnungseffekt minimiert werden. Diese Verdünnungseffekte können bei sehr niedriger Anzahl von DNA-Kopien eine große Rolle spielen, da es dadurch zu falsch-negativen Ergebnissen kommen kann. In einer Studie von J. Springer aus dem Jahr 2012 wird empfohlen, immer drei Replikate zu testen, da die Wahrscheinlichkeit eines falsch negativen Testergebnisses bei sehr geringen Mengen von *Aspergillus fumigatus*-DNA in einer einzigen Probe des Eluats sehr hoch

ist [26]. Die C<sub>q</sub>-Werte waren zwar nicht konsistent, aber in den meisten Fällen war eines von drei Replikaten positiv [26].

Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurden immer vorher getestete Mengen an *Aspergillus fumigatus*-DNA in die Proben eingegeben. Bei 10 Kopien traten dieselben Probleme auf, wie in der Veröffentlichung von J. Springer aus dem Jahr 2011 [18]. Zu bedenken ist allerdings, dass es sich bei den Versuchen zur Optimierung des Mastermixes um wässrige Lösungen handelte und vorher keine DNA-Aufbereitung im Sinne von Serumextraktion stattgefunden hatte. Da die genauen Mengen an *Aspergillus fumigatus*-DNA und *Bacillus subtilis*-DNA bekannt waren, konnten die unteren Grenzen der Detektion von *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* ermittelt und dementsprechend die Mengen an Primer und Sonden angepasst und optimiert werden.

#### 4.2 Ermittlung des idealen Elutionsvolumens

In der Studie von J. Springer *et al.* aus dem Jahr 2011 wurde eine Extraktion aus Vollblut erstellt. Hier wurde ein Elutionsvolumen von 100 µl verwendet [18, 26]. In einer weiteren Arbeit wurde beobachtet, dass sich Elutionsvolumina über 100 µl negativ auf die Sensitivität auswirken. Dies ist bedingt durch den Verdünnungseffekt, der durch das größere Volumen entsteht [33]. In meiner Arbeit wurde ein Elutionsvolumen von 35 µl verwendet, so konnte das Eluat noch weiter konzentriert werden. Wie sich in den Versuchen mit verschiedenen Elutionsvolumina zeigte, konnten bei 35 µl die niedrigsten C<sub>q</sub>-Werte erreicht werden. Der Gedanke hinter der Reduktion des Elutionsvolumens war, eine möglichst geringe Anzahl an DNA-Kopien zu detektieren und das Eluat möglichst vollständig zu testen. Mit den 35 µl Eluat konnten, wie in den Versuchen mit Vollblut, ebenfalls Triplikate erstellt werden [18]. Da immer 10 µl pro Probe verwendet wurden, waren 35 µl die ideale Elutionsmenge, mit der das gesamte Eluat getestet werden konnte. Eine andere Theorie hingegen wäre, dass einige DNA-Fragmente bei geringer Menge an AVE-Puffer in den Membranen zurückbleiben. Aus diesem Grund wurde bei den Versuchen im Monoplexformat zum einen ein zweites Eluat mit 35 µl angefertigt und zum anderen wurde

zusätzlich bei diesem Eluat die Zeit der Zentrifugation um eine Minute erhöht. Diese Theorie bestätigte sich sowohl bei den Versuchen mit *Aspergillus fumigatus* als auch bei Versuchen mit *Bacillus subtilis*. Dies wird unter 4.3.1 noch weiter ausgeführt.

## 4.3 Versuche im Monoplexformat

### 4.3.1 Probleme der DNA-Aufbereitung

Die Versuche im Monoplexformat zeigten verschiedene Schwachstellen bei der Aufbereitung der DNA aus Humanserum auf. Eine Schwachstelle ist ,dass es für die routine-massige DNA-Aufbereitung von *Aspergillus fumigatus* bis heute keine speziellen Kits gibt [34]. Das erste Problem ist der Verlust von DNA bei der Aufbereitung. Wie bereits beschrieben, wurden in die Humanserumproben vorher getestete DNA-Mengen eingegeben und dann aufbereitet. So konnte eine Aussage über den Verlust an DNA während der Aufbereitungsphase getroffen werden. Wie die Versuche zeigten, blieb teilweise sehr viel DNA in den Membranen zurück. Dies belegen die C<sub>q</sub>-Werte des zweiten Eluats (siehe Ergebnisteil 3.3.1.1 und 3.3.1.3), die bei niedrigen DNA-Konzentrationen teilweise sogar niedriger waren als im ersten Eluat. Sowohl bei *Aspergillus fumigatus* als auch bei *Bacillus subtilis* kann dies nachgewiesen werden. Ein Grund für die niedrigeren C<sub>q</sub>-Werte im zweiten Eluat könnte die längere Inkubationszeit und/oder die zweite Zentrifugation sein. Denkbar wäre aber auch, dass ein Teil der DNA wegen des geringeren Elutionsvolumens im Filter zurückbleibt. Gerade bei sehr geringen Mengen an *Aspergillus fumigatus*-DNA, wie sie im Blut in der Anfangsphase der Infektion zu erwarten ist, wäre es sinnvoll, diesen letzten Schritt der Aufbereitung noch zu optimieren, um so auch sehr geringe Mengen an *Aspergillus fumigatus*-DNA in der aufbereiteten Probe zu detektieren. Denkbar wäre auch, dass man die Inkubationszeit verlängert oder zwei Eluate in ein Sammelgefäß abzentrifugiert, um so eine maximale Ausbeute an DNA zu erhalten und die Detektionsgrenze weiter nach unten zu verschieben.

Ein Problem bei der DNA-Extraktion stellt die komplexe Zellwand von Schimmelpilzen dar, die während der Aufbereitung rupturiert werden muss [34]. In dieser Arbeit wurde

auf alle Schritte der mechanischen Zellwandlyse verzichtet, im Gegensatz zu den Versuchen mit Vollblut [18]. Dies stellt eine geringe Zeitersparnis dar. Ob die Zellyse auf die Aufbereitung der DNA Einfluss hat, konnte in dieser Arbeit nicht herausgearbeitet werden.

In einer Veröffentlichung von Lisa J. Griffiths wurden verschiedenen Methoden der *Aspergillus*-DNA Extraktion evaluiert. Es wurden 6 Methoden zur Zellwand-Lyse verglichen,

1. Methode „freeze-thaw“: 10 µl Wasser mit verschiedenen Konzentrationen an Konidien werden mit 600 µl Sorbitol-Puffer vermischt. Dann werden die Proben mit -70 °C für 10 min gefroren und dann bei Raumtemperatur aufgetaut.
2. Methode „freeze-boil“: 10 µl Wasser mit verschiedenen Konzentrationen an Konidien werden in 600 µl Sorbitol-Puffer gegeben, dann für 10 min auf -70 °C gefroren und dann für 2 min bei 100 °C gekocht.
3. Methode „enzyme digestion“: 10 µl Wasser mit verschiedenen Konzentrationen an Konidien werden mit 600 µl Sorbitol-Puffer vermischt, dann wird Lyticase (200 U;Sigma) hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.
4. Methode „bead beating“: 10 µl Wasser mit verschiedenen Konzentrationen an Konidien werden mit 600 µl Sorbitol-Puffer vermischt. Keramikugeln, sogenannte „beads“ (0,5 g, 0-5mm diameter, Biospec), werden vermischt und für 3 min mit dem Mini-BeadBeater-8 geschüttelt.
5. Methode „enzyme digestion und bead beating“: 10 µl Wasser mit verschiedenen Konzentrationen an Konidien werden mit 600 µl Sorbitol-Puffer vermischt. Dann wird den Proben Lyticase (200 U, Sigma) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Mischung wird dann mit 11000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet wird mit 360 µl AL-Puffer und 20 µl Proteinkinase K mit der Konzentration von 20 mg/ml (beide aus dem Qiagen-Kit) getränkt. Dann werden Keramikugeln hinzugegeben und wie unter Methode 4 geschüttelt.
6. Methode „bead beating with a different lysisbuffer“: 10 ml Wasser mit verschiedenen Konzentrationen an Konidien werden mit 360 µl AL-Puffer und 20 µl

Proteinkinase K 20mg/ml vermischt. Dann werden wie unter Methode 4 Kermikugeln hinzugegeben und geschüttelt.

Neben den oben beschriebenen manuellen Methoden wurden zwei handelsübliche automatisierte Extraktionsplattformen (Qiagen) und MagNA Pure (Roche) bewertet. Die Extraktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die DNA- Extrakte wurden mit der Real-Time PCR verglichen. Die besten Ergebnisse bei der DNA-Ausbeute sowie der Qualität und Quantität wurden in dieser Studie mit der „bead-baeting-Methode“, gefolgt von der „bead-beating with a different lysisbuffer-Methode“, erzielt [35].

Bei der DNA-Aufbereitung ist es unerlässlich, möglichst alle Serumkomponenten, wie Proteine, Elektrolyte, Medikamente oder andere Abfallprodukte, herauszufiltern, da diese die PCR-Amplifikation beeinflussen können [36].

Ein weiteres Problem, das sich bei dieser Arbeit ergab, war, dass bei sehr geringen Mengen DNA in wässriger Lösung diese sich innerhalb weniger Stunden zersetzte. Denkbar wäre, dass sich eine DNase in den Verdünnungsproben befand. Beweisen lässt sich dies allerdings abschließend nicht. Die Frage, die man sich aber kritisch stellen muss, ist, ob die bei Patienten entnommenen Blutproben mit geringen Mengen von *Aspergillus fumigatus*-DNA ebenfalls diesen Zersetzungsprozessen unterliegen. Falls dies der Fall wäre, müssten die Blutproben entweder sofort aufbereitet oder die Zersetzungsprozesse z.B. durch Einfrieren der Probe gestoppt werden. Bei den Versuchen im Monoplexformat wurden sowohl frische als auch gefrorene Proben getestet. Es ergab an sich keine unterschiedlichen Cq-Werte in frischen oder gefrorenen Serumproben. Die Proben wurden allerdings erst nach dem Auftauen mit *Aspergillus fumigatus* oder *Bacillus subtilis* versetzt. In zukünftigen Versuchen könnte man beispielsweise die frischen Humanserumproben mit *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* infizieren und dann erneut einen Vergleich der Cq-Werte zwischen den Proben, die direkt nach Abnahme infiziert und eingefroren wurden, und den Proben, die nach der Abnahme infiziert und für die gleiche Zeit im Kühlschrank aufbewahrt wurden, vornehmen. So könnte eine eventuelle DNA-Zersetzung im

Humanserum gezeigt werden. Bei *Bacillus subtilis* wurden ähnliche Ergebnisse wie bei *Aspergillus fumigatus* erzielt. Auch bei diesen Versuchen kam es bei niedrigeren DNA-Konzentrationen zur Zersetzung der DNA, weswegen auch hier stets neue Verdünnungsreihen angefertigt werden mussten. Der Verlust an DNA während der Extraktion von *Bacillus subtilis* war ähnlich groß wie bei *Aspergillus fumigatus*. Am wichtigsten bei der DNA-Extraktion ist es, die maximale Ausbeute an DNA zu erhalten, um so möglichst geringe Mengen an *Aspergillus fumigatus*-DNA zu detektieren.

Während der Versuche im Monoplexformat kam es zu Lieferengpässen von GEX-Mastermix. Zudem waren die Ergebnisse bei den neueren Chargen (Charge 1110130) von GEX sehr unterschiedlich. Zum Teil waren die Cq-Werte deutlich erhöht im Vergleich zu den älteren Chargen. Dies war sowohl bei *Aspergillus fumigatus* als auch bei *Bacillus subtilis* zu beobachten. Aus diesem Grund wurden die Versuche vorerst mit Sso-Mastermix weitergeführt. Im Sso-Mastermix waren die Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* wieder stabil, für *Bacillus subtilis* hingegen war ein positives Signal zu messen, obwohl nachweislich keine Verunreinigung oder Kontamination mit *Bacillus subtilis* bestand. Wie bereits erwähnt, waren die Cq-Werte für *Bacillus subtilis* zwischen 36-40 Zyklen; diese Werte waren bei jeder Negativkontrolle nachweisbar und reproduzierbar. Dieser Cq-Wert entspricht in wässriger Lösung ca.  $10^3$  Kopien *Bacillus subtilis* DNA im GEX-Mastermix. Denkbar wäre eine größere Menge an *Bacillus subtilis*-DNA in die Proben einzugeben, um so reproduzierbare Cq-Werte zu erhalten.

#### 4.3.2 Kontamination bei der DNA-Aufbereitung

Ein großes Problem bei der Aufbereitung und Extraktion der *Aspergillus fumigatus*-DNA aus Humanserum ist, dass es immer wieder zu Verunreinigungen der Extraktionskontrollen kommt. Diese Verunreinigungen lassen sich durch sehr sorgfältiges Arbeiten, aber auch durch einen erfahrenen Untersucher deutlich reduzieren. Diese Problematik wurde auch schon in einer Veröffentlichung von J. Springer *et al.* 2011 beschrieben. Hier wurde das hohe Risiko einer Kontamination des PCR-Assays durch sich in der Luft befindliche Konidien von *Aspergillus fumigatus* beschrieben [18]. Aus diesem Grund wurden alle Schritte, die zur DNA-Aufbereitung unternommen wurden, unter einer Class 2 laminar flow Kabine durchgeführt.

In einer Studie von E. Harrison *et al.* (2010) wurde die Kontamination verschiedener Sammelröhrchen für Blut, Urin und andere Körperflüssigkeiten untersucht. Es waren 14 % der mit Antikoagulansien bedampften und 19 % der mit flüssigen Antikoagulansien befüllten Blutröhrchen mit *Aspergillus fumigatus*-DNA kontaminiert, 6 % der Serumröhrchen mit sprühgetrocknetem Koagulationsaktivator und 15 % der Serumröhrchen ohne Koagulationsaktivatoren waren mit *Aspergillus fumigatus*-DNA verunreinigt [37].

Um eine Kontamination der Komponenten für den Mastermix zu verhindern, wurde dieser in einem anderen Raum erstellt. Alle für den Mastermix benötigten Verbrauchsmaterialien wurden in einem separaten Kühlschrank gelagert, der ausschließlich für die Komponenten des Mastermixes bestimmt war. Dieses Vorgehen wurde schon in einer Veröffentlichung von J. Löffler *et al.* (1990) empfohlen. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle in dieser Studie als unerlässlich bezeichnet, da Komponenten des PCR-Assays mit *Aspergillus fumigatus*-Sporen kontaminiert sein könnten [25].

Eine Extraktionskontrolle bietet sowohl eine Qualitätskontrolle über den Verlauf der DNA-Aufbereitung als auch eine Aussage über den DNA-Verlust während der Aufbereitung.



### 4.3.3 Vergleich verschiedener Blutkompartimente in der PCR

In einer Arbeit von Lau A. *et al.*, die sich mit Patienten beschäftigte, die an einer systemischen Candidose erkrankt waren, wurde mit einer Multiplex-PCR getestet. Es wurden Vollblut, Serum und Plasma getestet und miteinander verglichen. 71 % der 109 Patienten hatten im Serum positive Ergebnisse, 75 % im Plasma und nur 54 % im Vollblut. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Serum und Plasma. Deutlich war der Unterschied zum Vollblut. Wie dieser zustande kommt, ist unklar [38]. Eine weitere Veröffentlichung verglich Serum und Vollblutproben von Patienten mit invasiver Aspergillose an verschiedenen Universitätskliniken weltweit. Hier zeigte sich der Trend, dass bei Vollblut eine frühere Diagnose gestellt (nach 15 Tagen vs. 36 Tagen) und auch eine höhere Sensitivität (86 % vs. 79 %) erreicht werden konnte. In dieser Studie wurde aber auch beschrieben, dass die DNA-Aufbereitung von Serum deutlich einfacher und schneller ist als die von Vollblut [39]. Eine andere retrospektive Studie verglich die Performance einer Serum- und einer Plasma-PCR. Ergebnis dieser Studie war, dass die Sensitivität bei Plasma bei 94,7 % und die Spezifität bei 83,3 % lag, wohingegen Serum eine Sensitivität von 68,4 % und eine Spezifität von 76,2 % hatte. Es konnte auch eine frühere Detektion von *Aspergillus fumigatus* im Plasma gezeigt werden [40]. Dies zeigt, dass die Serumextraktion auch bei *Aspergillus fumigatus* sehr sinnvoll ist. In Bezug auf *Aspergillus fumigatus* wurden in einer Studie von White PL *et al.* die Sensitivität und Spezifität im Galaktomannan-ELISA getestet. Verglichen wurden Plasma und Serum. Das Plasma hatte signifikant höhere *Aspergillus fumigatus*-DNA-Konzentrationen als das Serum ( $p=0,0398$ ). Dies wurde auf die Koagulation zurückgeführt [41]. Nachteil an der Plasma-Testung ist der Fibrinogenanteil, der nur in diesem Blutkompartiment zu finden ist und nicht im Serum. Dieser Gerinnungsfaktor wird durch Magnesium aktiviert und löst so durch die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin eine Koagulation aus, was zu einem negativen Einfluss auf die Testergebnisse in der PCR führen kann. Magnesium ist ein essentieller Teil bei der PCR [42]. In einer Veröffentlichung von Leticia Bernal-Martinez *et al.* wurde die Theorie vertreten, dass sich Serum am besten für die *Aspergillus fumigatus*-PCR eignet, da sich die Serumsaufbereitung einfacher gestaltet als die von Vollblut

[43]. Zudem muss bei Vollblut immer eine Antikoagulans, wie EDTA, verwendet werden. Diese Antikoagulantien können ebenfalls zu Inhibitionen führen und so die Cq-Werte deutlich beeinflussen. Auch eine Kontamination durch Antikoagulantien wie Heparin und Citrat ist möglich [44, 45]. In einer Studie von Suarez *et al.* konnte gezeigt werden, dass durch eine PCR aus einer Serumextraktion die frühe Erkennung einer invasiven Aspergillose möglich ist, wenn man große Mengen an Serum beim Patienten auf *Aspergillus fumigatus*-DNA testet. Die Serum-PCR erzielte in dieser Studie deutlich schneller Ergebnisse als der Galactomanna-ELISA [46].

McCulloch *et al.* verglichen in einer Veröffentlichung EDTA-Blut, Serum und Blutgerinnsel. Die Proben stammten aus einem Tierversuch, bei dem Tiere Immunsuppressiva bekamen und dann infiziert wurden. Vier Tage nach Infektion wurden die oben genannten Blutproben entnommen. Im Ergebnis konnte am meisten DNA im Blutgerinnsel gemessen werden. Hier waren es 2,38 PCR-Zyklen weniger als im EDTA-Blut und sogar 3,69 Zyklen weniger als im Serum. Das bedeutet, dass die Ausbeute an DNA im Gerinnsel um das 7,9-12-fache höher war als im EDTA-Blut und im Serum. Das Problem dabei ist jedoch, dass die routinemäßige Aufbereitung der Gerinnselprobe sehr schwer umsetzbar ist [30].

In einer Studie von J. Löffler konnte gezeigt werden, dass sich eingegebene genomische *Aspergillus fumigatus*-DNA innerhalb von 30 min im EDTA-Blut durch alle Fraktionen bewegt und verteilt. Vermutet wurde hier molekulare Gravitation, aber auch Bindung an Rezeptoren, die sich auf den Leukozyten befinden [10]. Eine Rezeptorbindungsstelle für *Aspergillus fumigatus*-DNA konnte durch Bennett *et al.* auf den Leukozyten nachgewiesen werden [47]. Dies würde die deutlichere Anreicherung an DNA-Fragmenten im Gerinnsel erklären.

#### 4.3.4 Die Serum-PCR im Vergleich und in Kombination mit anderen diagnostischen Verfahren bei der invasiven Aspergillose

XU, Pan-feng et al. haben in einer Publikation aus dem Jahr 2012 eine Kombination von Lungencomputertomographie und Serum Antigen-Assays bei Patienten mit pulmonaler invasiver Aspergillose ohne akute Neutropenie evaluiert. 113 Patienten wurden in dieser Studie untersucht. Bei allen Patienten wurde das Serum mit Galaktomannan-Assay und 1-3-beta-D-Glucan getestet, zusätzlich wurden CT-Scans der Lunge durchgeführt. Die pulmonale invasive Aspergillose wurde in „mögliche, wahrscheinliche und sichere“ eingeteilt. Es waren 4 sichere, 36 wahrscheinliche, 16 mögliche und 56 Patienten ohne pulmonale invasive Aspergillose. Ergebnis dieser Studie war, dass der Galaktomannan-Assay sensitiver als der 1-3-beta-D-Glucan-Test ist. Die Spezifität von 2 positiven Serumtests war retrospektiv bei 84,2 % und 87,7 %. Die Sensitivität des CT-Scans war bei nur 30 %. Die Spezifität von Galaktomannan und CT-Scan war bei 100 %, während die Sensitivität bei nur 47,5 % lag. Diese Studie zeigte, dass die Kombination von CT und Galaktomannan-Assay die Spezifität der Diagnose pulmonale invasive Aspergillose bei Patienten ohne Neutropenie deutlich verbessert [48]. Die typischen Zeichen einer invasiven Aspergillose im CT sind das sogenannte „Halo-Zeichen“ und das „Air-Crescent-Zeichen“. Das „Halo-Zeichen“ ist ein sensitiver aber kein spezifischer Marker der invasiven Aspergillose. Die „Halo-Zeichen“ traten in einer Studie von Caillot, D et al. bei 24 von 25 Patienten am Tag der Diagnosestellung auf, jedoch waren diese Zeichen nicht sehr langlebig. Am 3. Tag waren sie noch bei 68 % der untersuchten Patienten vorhanden am 7. Tag nur noch bei 22 %. Das „Air-Crescent-Zeichen“ hingegen war am 3. Tag bei 8 %, am 7. Tag bei 14 % und am 14. Tag bei 68 % im CT zu erkennen [49]. Galaktomannan ist ein Polysaccharid der Zellwand von *Aspergillus fumigatus*, das bei der invasiven Aspergillose im Blut zirkuliert [50]. Der Galaktomannan-Assay zeigt bei Patienten, die Chemotherapie oder eine hämatologische Stammzelltransplantation bekommen haben, eine Sensitivität in verschiedenen Studien von 67-100 % und eine Spezifität von 86-99 %, wobei bei Patienten, die keine Neutropenie hatten, die Spezifität deutlich niedriger war (15-30%) [51]: So konnte bei Patienten, die täglich mit dem Galaktomannan-Assay getestet

wurden, nach 7-14 Tagen eine sichere Diagnose gestellt werden [52]. 1-3-beta-D-Glucan im „Standard Limulus farbmetrischen Assay“ hatte eine Sensitivität von 67-100 % und eine Spezifität von 84-100 % [53]. In einer Studie von Senn, L. et al. konnte gezeigt werden, dass mit dem 1-3-beta-D-Glucan-Assay die Diagnose invasive Aspergillose bereits am dritten Tag gestellt werden konnte [54].

*Aspergillus fumigatus* kann in verschiedenen Kompartimenten, wie Sputum [9], Broncholavage der Lunge (BAL), Liquor und Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden. In einer Publikation von Shuzhen Zhang et al. aus dem Jahre 2016 wurde die Performance von Galaktomannan-Assay und qPCR aus BAL und Serum bei Patienten untersucht, die nicht an einer Neutropenie litten. Bei den Serumproben zeigten sich in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen Galaktomannan-Assay und qPCR in Bezug auf die Spezifität und die Sensitivität. In den BAL-Proben zeigte die qPCR eine Spezifität von 92,5 %, wo hingegen der Galaktomannan-Assay nur 68,8 % erreichte, bei der Sensitivität hatten qPCR und Galaktomannan-Assay jeweils 90 %. Im Vergleich zwischen BAL- und Serumproben könnte gezeigt werden, dass die BAL-Probe zur Serumprobe eine deutlich bessere Sensitivität beim Galaktomannan-Assay (90 % vs. 50 %) und bei der qPCR (90 % vs. 60 %) aufweist. In dieser Studie kam man zu dem Schluss, dass bei Patienten, die nicht an einer Neutropenie leiden, die Diagnostik von BAL-Proben denen von Serumproben überlegen sind [55].

#### 4.4 Versuche im Duplexformat

Ziel dieser Versuche war es, einen Indikatorkeim in jeder Probe zu etablieren, um so eine Extraktionskontrolle zu erhalten, die Aufschluss über Qualität und Verlauf der DNA-Aufbereitung gibt. Eine wichtige Frage war: „Gibt es eine Inhibition oder andere Beeinflussungen der Sonden oder Primer im Duplexformat?“

Nach Auswertung der Versuche im Sso-Mastermix ohne *Bacillus subtilis*-DNA ergaben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen Monoplex- und Duplexformat. In der Auswertung waren die C<sub>q</sub>-Werte für *Aspergillus fumigatus* sogar im Duplexformat niedriger als im Monoplexformat (siehe 3.4.1.1). Bis zu 10<sup>2</sup> Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA hatte das Duplexformat einen positiven Einfluss auf die C<sub>q</sub>-Werte für *Aspergillus fumigatus*; dies bestätigte sich in allen Versuchen. Auch bei den Versuchen im Duplexformat mit 10<sup>4</sup> Kopien und 10<sup>5</sup> Kopien *Bacillus subtilis* verringerten sich die C<sub>q</sub>-Werte für *Aspergillus fumigatus* bis 10<sup>2</sup> Kopien (siehe 3.4.1.2). Erst bei einer Gesamtanzahl von 10 *Aspergillus fumigatus*-DNA-Kopien kam es zu vereinzelt falsch negativen Ergebnissen. Bei 10 Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA hatte auch die Menge an eingegebener *Bacillus subtilis*-DNA einen deutlichen Einfluss auf die C<sub>q</sub>-Werte für *Aspergillus fumigatus* (Abbildung 15). In einer Studie von J. Springer *et al.* wurden verschiedene Assays und Verfahren miteinander verglichen. Auch hier gab es bei sehr geringen Mengen von *Aspergillus fumigatus*-DNA-Kopien sehr häufig falsch-negative Ergebnisse [18]. Der Unterschied zwischen der Studie von J. Springer und dieser Arbeit ist, dass die Versuche ohne vorherige DNA-Extraktion aus Serum oder Vollblut durchgeführt wurden. Nachteil ist, dass man die Ergebnisse nicht direkt vergleichen kann. Vorteil hingegen ist aber, dass man die genaue Menge der *Aspergillus fumigatus*-DNA vorher kannte und so die untere Grenze der PCR, das sog. „Limit of detection“ kurz „LoD“, relativ genau feststellen konnte. In diesem Fall ist das „LoD“ im Sso-Mastermix bei 10 Kopien *Aspergillus fumigatus*-DNA. Wie schon bei den Versuchen im Monoplexformat ist beim Sso-Mastermix immer ein positives *Bacillus subtilis*-Signal zu messen. Bei diesen Versuchen war der C<sub>q</sub>-Wert zwischen 36-40 Zyklen bei Proben ohne *Bacillus subtilis* zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass bis zu einer Menge von 10<sup>5</sup> Kopien *Bacillus subtilis*-DNA

keine Veränderungen für die Cq-Werte bis  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* zu erkennen waren. Es gab aber einen Einfluss auf die Cq-Werte für *Bacillus subtilis* (siehe 3.4.4). Die Cq-Werte erhöhten sich, je weniger *Aspergillus fumigatus*-DNA in den Proben war. Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte nicht gefunden werden. In diesem Fall muss aber davon ausgegangen werden, dass es einen bislang unbekanntem Einfluss auf die Cq-Werte von *Aspergillus fumigatus* und von *Bacillus subtilis* gibt. Aus diesem Grund scheint eine Extraktionskontrolle mittels *Bacillus subtilis* im Duplexformat und Sso-Mastermix nicht geeignet zu sein, da keine Aussage über den Verlauf der Extraktion getroffen werden könnte.

Das Lieferproblem des GEX-Mastermix konnte im Laufe dieser Arbeit behoben werden, so dass auch bei neueren Chargen stabile Cq-Werte bei den neu angefertigten Verdünnungsreihen erreicht werden konnten. Bei derselben Versuchsanordnung (3.4.1.1) konnten Sso-Mastermix und GEX-Mastermix verglichen werden. Beim GEX-Mastermix zeigten sich wie im Sso-Mastermix niedrigere Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* im Duplexformat ohne *Bacillus subtilis*-DNA (3.4.2.1). Dieser Einfluss der *Bacillus subtilis*-Primer und -Sonden scheint die Sensitivität zu erhöhen. Bei den Proben mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis*-DNA und  $10^2$  Kopien *Aspergillus fumigatus* gab es keinen Einfluss. Bei  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis* gab es jedoch im Gegensatz zum Sso-Mastermix eine deutliche Cq-Wert-Erhöhung für *Aspergillus fumigatus*. Noch deutlichere Unterschiede bezüglich des Einflusses von *Bacillus subtilis*-DNA in den Proben gab es bei 10 Kopien *Aspergillus fumigatus*. Hier erhöhten sich die Cq-Werte um 6 Zyklen bei eingegebenen  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* und bei  $10^5$  Kopien um 11,5 Zyklen (Abbildung 16). *Bacillus subtilis*-DNA scheint nach dieser Auswertung einen Einfluss auf das „LoD“ zu haben und es scheint eine Suggestion auf die Stabilität der Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* zu geben. Diese ist aber in Abhängigkeit von der Menge an *Bacillus subtilis*-DNA zu sehen. Die Cq-Werte für *Bacillus subtilis* waren bei den hier eingegebenen *Aspergillus fumigatus*-DNA Mengen im GEX-Mastermix nicht beeinflusst worden. Warum es zu einer Beeinflussung der Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* kam, konnte nicht geklärt werden. Eine direkte Inhibition der Sonden von *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* scheint es aber nicht zu geben, da sich die Cq-Werte von *Bacillus subtilis* nicht beeinflussen

ließen und sich, auch bei den Versuchen im Duplexformat ohne *Bacillus subtilis*, keine deutliche Auswirkung auf die Stabilität der Cq-Werte zeigte, obwohl man sie in diesem Fall erwartet hätte. Die Instabilität und die Erhöhung der Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* steht in direkter Abhängigkeit zu der Menge an eingegebener *Bacillus subtilis*-DNA (3.4.2.2). Eine Beeinflussung von Cq-Werten wurde ebenfalls von J. Springer *et al.* 2012 beschrieben. In dieser Veröffentlichung wurde eine gegenseitige Inhibition der Sonden für *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* vermutet [26]. Schon in einer Arbeit von Challier *et al.* 2004 wurde eine mögliche Inhibition der Primer und Sonden in der Multiplex-PCR zur Detektion von *Aspergillus fumigatus* beschrieben [56]. Nicht nur bei der Pilz-PCR ist die Inhibition durch Sonden und Primer ein Problem. Es scheint vielmehr ein häufiges Problem bei Multiplex-Assays zu sein [57], was auch in den MIQE-Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) so zu lesen ist. Die Empfehlung dieser Guideline ist, die Art der Inhibition in jeder Publikation genau zu beschreiben, um so eine Reproduktion und Modifikation des Assays und des Extraktionsprotokolls für andere zu ermöglichen [23]. Zusätzlich wird noch eine positive Kontrollprobe empfohlen, um so eine mögliche Inhibition zu entlarven [58]. Die Cq-Wertinstabilität trat erst bei sehr hohen Mengen an *Bacillus subtilis*-DNA auf. In diesem Fall waren es  $10^5$  Kopien. Bei einer Zahl von  $10^4$  Kopien war der Einfluss noch sehr gering. Die Cq-Werte für *Bacillus subtilis* waren bei einer DNA-Menge von  $10^4$  Kopien im Mittel 33,3 Zyklen. Wie bereits erwähnt, gab es bei den Versuchen keinen deutlichen Einfluss auf die Cq-Werte für *Bacillus subtilis* im GEX-Mastermix (Abbildung 17). Eine Extraktionskontrolle mit *Bacillus subtilis* wäre bei dieser Menge an *Bacillus subtilis*-DNA nicht möglich, da sie die Cq-Werte bei niedriger Kopienzahl für *Aspergillus fumigatus* deutlich erhöht (Abbildung 16). Denkbar wäre aber, die Menge an *Bacillus subtilis* so zu reduzieren, dass man immer noch stabile Cq-Werte nach Serumextraktion für *Bacillus subtilis* erhält, die dann aber, auch bei niedrigen Mengen an DNA, keinen deutlichen Einfluss auf die Cq-Werte von *Aspergillus fumigatus* haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der GEX-Mastermix im Duplexformat sich sogar positiv auf die Sensitivität für *Aspergillus fumigatus* auswirkt. Eine Beeinflussung der Cq-Werte war nur in Abhängigkeit von der eingegebenen Menge an *Bacillus subtilis*-DNA zu beobachten. Wie in den Versuchen im Monoplexformat gezeigt werden konnte, kam es bei der DNA-

Aufbereitung zu einem Faktor von im Mittel 4,0 bei  $10^3$  Kopien. Wenn die *Bacillus subtilis*-DNA-Menge von  $10^3$  Kopien in die Serumproben eingegeben werden und einem DNA Verlust von ca. Faktor 4 unterliegen, könnten theoretisch immer noch stabile Cq-Werte für *Bacillus subtilis* erzielt werden, die keinen deutlichen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* hätten. So könnte beim GEX-Mastermix eine Extraktionskontrolle erfolgreich sein.



## 5. Zusammenfassung

Die invasive Aspergillose spielt in der modernen Medizin und speziell bei malignen Blutkrankungen, die mit einer Immunsuppression des Patienten einhergehen, eine entscheidende Rolle. Die bisherigen Methoden erlauben eine Diagnose meist erst sehr spät oder liefern oft falsch-negative Ergebnisse. Bis zum heutigen Tag ist es nicht gelungen, ein standardisiertes Verfahren zur PCR-Diagnostik aus Blutproben zu etablieren.

In den der Arbeit zugrunde liegenden Versuchsreihen wurden verschiedene Ansätze an Mastermix im Monoplex- und Duplexformat zur *Aspergillus fumigatus*-Detektion in Humanserum getestet und optimiert. Es wurde versucht, eine Extraktionskontrolle mit *Bacillus subtilis* in die Probe zu integrieren, um so die Aussagekraft der extrahierten Probe zu evaluieren.

Dabei zeigte sich ein Elutionsvolumen von 35 µl am effizientesten. Der Cq-Wert war bei 35 µl Elutionsvolumen ca. einen Zyklus niedriger als bei 65 µl und 1,5-2 Zyklen niedriger als bei 100 µl. Bei den Versuchen im Monoplexformat konnte gezeigt werden, dass bei der Extraktion viel DNA in den Filtern zurückbleibt. Es wurden aus einer Serumextraktion zwei Eluate mit je 35 µl Elutionsvolumen erstellt und getestet. Hier zeigten sich in Abhängigkeit von der Menge der DNA teils hohe Cq-Werte im zweiten Eluat, bei einigen Proben aber sogar ein niedrigerer Cq-Wert im zweiten Eluat. Dies war sowohl für *Aspergillus fumigatus* als auch für *Bacillus subtilis* zu beobachten. Die Gründe für dieses Ergebnis könnten die längere Inkubationszeit und die zweite Zentrifugation des zweiten Eluats sein.

Die Extraktionseffizienz hatte bei der Aufbereitung mit dem QIAamp Ultrasens Kit (Qiagen) einen Faktor von im Mittel 2,7 bei *Aspergillus fumigatus* und von 4,7 bei *Bacillus subtilis* beim GEX-Mastermix. Beim Sso-Mastermix lag der Faktor für *Aspergillus fumigatus* im Mittel bei 4,4 und der für *Bacillus subtilis* bei 5,4.

Bei den Versuchen im Duplexformat wurden sowohl *Aspergillus fumigatus* als auch *Bacillus subtilis* in unterschiedlichen Konzentrationen in dieselbe Probe eingebracht. Hier zeigte sich, dass im Sso-Mastermix die Menge an *Bacillus subtilis*-DNA und an *Aspergillus fumigatus*-DNA einen deutlichen Einfluss auf die jeweiligen Cq-Werte und die Sensitivität haben. Zusätzlich zeigte der Sso-Mastermix immer ein positives Ergebnis für *Bacillus subtilis* zwischen 36-40 Zyklen. Beim GEX-Mastermix hatte die Menge an *Bacillus subtilis*-DNA ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf die Cq-Werte und die Sensitivität für *Aspergillus fumigatus*. Die Cq-Werte für *Aspergillus fumigatus* erhöhten sich bei 10 Kopien mit  $10^4$  Kopien *Bacillus subtilis* um 6,1 Zyklen und bei  $10^5$  Kopien *Bacillus subtilis* um 10,6 Zyklen im GEX-Mastermix. Ein Einfluss auf die Cq-Werte für *Bacillus subtilis* konnte bei den Versuchen im Duplexformat mit GEX-Mastermix nicht verzeichnet werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Extraktionskontrolle mit *Bacillus subtilis* im Sso-Mastermix auf Grund der sich gegenseitig beeinflussenden Sonden und Primer sowie der DNA-Mengen an *Aspergillus fumigatus* und *Bacillus subtilis* nicht möglich ist, da keine Aussage über den Verlauf und die Effizienz der Extraktion getroffen werden könnte. Bei den Versuchen mit GEX-Mastermix konnte gezeigt werden, dass die Menge an eingegebener *Bacillus subtilis*-DNA einen entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität für die Cq-Werte von *Aspergillus fumigatus* in niedriger Konzentration hat. Einen Einfluss auf die Cq-Werte für *Bacillus subtilis* wurde nicht detektiert. Eine Extraktionskontrolle mittels *Bacillus subtilis* wäre denkbar, wenn die Menge eingegebener *Bacillus subtilis*-DNA so reduziert werden könnte, dass stabile Cq-Werte für *Bacillus subtilis* erreicht würden, die dann aber keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Sensitivität für *Aspergillus fumigatus* hätten.

## 6. Literaturverzeichnis, Abbildungsverzeichnis, Tabellenverzeichnis

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Latge, J.P., *The pathobiology of Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol, 2001. **9**(8): p. 382-9.
2. Latge, J.P., *Aspergillus fumigatus and aspergillosis*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(2): p. 310-50.
3. Maheshwari, R., G. Bharadwaj, and M.K. Bhat, *Thermophilic fungi: their physiology and enzymes*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(3): p. 461-88.
4. Hof, H. and R. Dörries, *Medizinische Mikrobiologie*. 2005, Stuttgart: Thieme. XX, 718 S. : 483-487.
5. Kwon-Chung, K.J. and J.A. Sugui, *Sexual reproduction in Aspergillus species of medical or economical importance: why so fastidious?* Trends Microbiol, 2009. **17**(11): p. 481-7.
6. Varga, J., *Mating type gene homologues in Aspergillus fumigatus*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 4): p. 816-9.
7. Paoletti, M., et al., *Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus*. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1242-8.
8. Denning, D.W., *Invasive aspergillosis*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(4): p. 781-803; quiz 804-5.
9. Fairs, A., et al., *Isolation of Aspergillus fumigatus from sputum is associated with elevated airborne levels in homes of patients with asthma*. Indoor Air, 2013. **23**(4): p. 275-84.
10. Loeffler, J., et al., *Analytical Comparison of In Vitro-Spiked Human Serum and Plasma for PCR-Based Detection of Aspergillus fumigatus DNA: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(9): p. 2838-45.
11. Chen, J., et al., *Risk factors for invasive pulmonary aspergillosis and hospital mortality in acute-on-chronic liver failure patients: a retrospective-cohort study*. Int J Med Sci, 2013. **10**(12): p. 1625-31.
12. Kosmidis, C. and D.W. Denning, *The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis*. Thorax, 2015. **70**(3): p. 270-7.
13. Blanco, J.L., et al., *[Aspergillosis: Mechanisms of pathogenicity implicated and approach to laboratory diagnosis.]*. Rev Iberoam Micol, 1998. **15**(1): p. 10-5.
14. von Eiff, M., et al., *Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival*. Respiration, 1995. **62**(6): p. 341-7.

15. Imbert, S., et al., *Aspergillus PCR in serum for the diagnosis, follow-up and prognosis of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients*. Clin Microbiol Infect, 2016.
16. Springer, J., et al., *Prospective multicentre PCR-based Aspergillus DNA screening in high-risk patients with and without primary antifungal mould prophylaxis*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(1): p. 80-6.
17. De Pauw, B., et al., *Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(12): p. 1813-21.
18. Springer, J., et al., *Pathogen-specific DNA enrichment does not increase sensitivity of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(4): p. 1267-73.
19. Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition. A new receptor for beta-glucans*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 36-7.
20. Arvanitis, M., et al., *PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(10): p. 3731-42.
21. Mengoli, C., et al., *Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(2): p. 89-96.
22. Aguado, J.M., et al., *Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based Aspergillus DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial*. Clin Infect Dis, 2015. **60**(3): p. 405-14.
23. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
24. Steinmann, J., J. Buer, and P.M. Rath, *Aspergillus fumigatus detection in blood from critical ill ICU patients using the SeptiFast assay*. J Clin Microbiol, 2016.
25. Loeffler, J., et al., *Contaminations occurring in fungal PCR assays*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(4): p. 1200-2.
26. Springer, J., et al., *A novel extraction method combining plasma with a whole-blood fraction shows excellent sensitivity and reproducibility for patients at high risk for invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(8): p. 2585-91.
27. Loeffler, J., et al., *Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(2): p. 586-90.
28. Lau, A., et al., *Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(9): p. 3021-7.

29. Millon, L., et al., *Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(10): p. 5097-101.
30. McCulloch, E., et al., *Don't throw your blood clots away: use of blood clot may improve sensitivity of PCR diagnosis in invasive aspergillosis*. J Clin Pathol, 2009. **62**(6): p. 539-41.
31. Mennink-Kersten, M.A., et al., *In vitro release by Aspergillus fumigatus of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(5): p. 1711-8.
32. Morton, C.O., et al., *Dynamics of extracellular release of Aspergillus fumigatus DNA and galactomannan during growth in blood and serum*. J Med Microbiol, 2010. **59**(Pt 4): p. 408-13.
33. White, P.L., et al., *Aspergillus PCR: one step closer to standardization*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1231-40.
34. Al-Samarrai, T.H. and J. Schmid, *A simple method for extraction of fungal genomic DNA*. Lett Appl Microbiol, 2000. **30**(1): p. 53-6.
35. Griffiths, L.J., et al., *Comparison of DNA extraction methods for Aspergillus fumigatus using real-time PCR*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 9): p. 1187-91.
36. White, P.L., et al., *Evaluation of Aspergillus PCR protocols for testing serum specimens*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(11): p. 3842-8.
37. Harrison, E., et al., *Aspergillus DNA contamination in blood collection tubes*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. **67**(4): p. 392-4.
38. Lau, A., et al., *Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(3): p. 811-6.
39. Springer, J., et al., *Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of Aspergillus DNA in high-risk hematological patients*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(5): p. 1445-50.
40. White, P.L., 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): p. 2832-7.
41. White, P.L., et al., *Comparison of galactomannan enzyme immunoassay performance levels when testing serum and plasma samples*. Clin Vaccine Immunol, 2013. **20**(4): p. 636-8.
42. Okada, M. and B. Blomback, *Factors influencing fibrin gel structure studied by flow measurement*. Ann N Y Acad Sci, 1983. **408**: p. 233-53.
43. Bernal-Martinez, L., et al., *Analysis of performance of a PCR-based assay to detect DNA of Aspergillus fumigatus in whole blood and serum: a comparative study with clinical samples*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(10): p. 3596-9.

44. Aubry, A., et al., *Occurrence and kinetics of false-positive Aspergillus galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 389-94.
45. Garcia, M.E., et al., *Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(4): p. 1567-8.
46. Suarez, F., et al., *Detection of circulating Aspergillus fumigatus DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(11): p. 3772-7.
47. Bennett, R.M., G.T. Gabor, and M.M. Merritt, *DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA*. J Clin Invest, 1985. **76**(6): p. 2182-90.
48. Xu, P.F., et al., *[Serum antigens assay combined with chest CT scan in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis]*. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2012. **41**(3): p. 332-8.
49. Caillot, D., et al., *Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia*. J Clin Oncol, 2001. **19**(1): p. 253-9.
50. Stynen, D., et al., *A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(2): p. 497-500.
51. Maschmeyer, G., et al., *Invasive mould infections: a multi-disciplinary update*. Med Mycol, 2009. **47**(6): p. 571-83.
52. Bretagne, S., et al., *Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(6): p. 1407-12.
53. Miyazaki, T., et al., *Plasma (1-->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(12): p. 3115-8.
54. Senn, L., et al., *1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(6): p. 878-85.
55. Zhang, S., et al., *Quantitative Real-Time PCR and Platelia Galactomannan Assay for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis: Bronchoalveolar Lavage Fluid Performs Better Than Serum in Non-neutropaenic Patients*. Mycopathologia, 2016. **181**(9-10): p. 625-9.
56. Challier, S., et al., *Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(2): p. 844-6.

57. Swango, K.L., et al., *Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples*. Forensic Sci Int, 2007. **170**(1): p. 35-45.
58. Huggett, J.F., et al., *Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon*. BMC Res Notes, 2008. **1**: p. 70.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1. Schematische Darstellung der PCR und Detektion der DNA (Quelle: Manual: AB StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR Systems–Standard Curve Experiments 2010 Applied Biosystems).....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 2. Vergleich der Elutionsvolumina. In der Abbildung sind 4 Versuche mit der gleichen Versuchsanordnung exemplarisch dargestellt. Die PCR wurde mit 55 Zyklen durchgeführt. Die Standardabweichung wurde in der Darstellung mit SE abgekürzt... 38</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 3. Schematische Darstellung der Aufbereitung von DNA für die PCR und Erstellen von zwei Eluat aus einer Humanserumprobe.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 4. Vergleich von erstem und zweitem Eluat mit je 35µl AVE Puffer für Aspergillus fumigatus. Dargestellt sind hier 8 Versuche mit Proben von aufbereiteter Aspergillus fumigatus-DNA, die zuvor in Humanserum eingegeben wurde. Es wurden pro Eluat je 3 Replikate getestet.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 5. Versuchsaufbau zur Testung der Extraktionseffizienz bei der Aufbereitung von Humanserum bei einer definierten Menge an DNA.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 6. Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung aus Humanserum mit Aspergillus fumigatus. Alle hier dargestellten Versuche wurden mit GEX-Mastermix durchgeführt, die PCR mit 55 Zyklen. Die Standardabweichung wurde mit SE abgekürzt. ....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 7. Vergleich von erstem und zweitem Eluat mit 35 µl AVE Puffer mit Bacillus subtilis. Die hier dargestellten Versuche wurden alle mit GEX-Mastermix durchgeführt. Die PCR wurde mit 55 Zyklen durchgeführt. Die Standardabweichung wurde mit SE abgekürzt. Es wurden je Eluat 3 Replikate getestet.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 8. Extraktionseffizienz der DNA-Aufbereitung aus Humanserum mit Bacillus subtilis. Alle hier dargestellten Versuche wurden mit GEX-Mastermix durchgeführt. Die PCR wurde mit 55 Zyklen durchgeführt.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 9. Unterschiede zwischen den Cq-Werten von Aspergillus fumigatus in Sso-versus GEX-Mastermix. Alle hier dargestellten Versuche wurden in wässriger Lösung durchgeführt. Es wurden je 3 Replikate pro Versuch getestet. ....</i>	<i>52</i>



<i>Abbildung 10. Unterschiede zwischen den Cq-Werten von Sso- versus GEX-Mastermix bei Bacillus subtilis. Alle hier dargestellten Versuche wurden in wässriger Lösung durchgeführt. Es wurden je 3 Replikate pro Versuch getestet. ....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 11. Vergleich der Cq-Werte mit extrahierter Aspergillus fumigatus-DNA im Sso- versus GEX-Mastermix. Es wurden je 2 Eluate á 35µl Elutionsvolumen getestet. Es wurden je 3 Replikate pro Eluat getestet. ....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 12. Vergleich der Cq-Werte extrahierter Bacillus subtilis-DNA in Sso- versus GEX-Mastermix. Es wurden je 2 Eluate mit á 35µl Elutionsvolumen getestet. ....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 13. Extraktionseffizienz von Aspergillus fumigatus-DNA im Sso-Mastermix im Monoplexformat. Verdünnung wurde in wässriger Lösung angefertigt. Elutionsvolumen war 35µl. Es wurden immer Triplikate getestet. ....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 14. Extraktionseffizienz von Bacillus subtilis-DNA im Sso-Mastermix im Monoplexformat. Verdünnung wurde in wässriger Lösung angefertigt. Elutionsvolumen war 35µl. Es wurden immer Triplikate getestet. ....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 15. Vergleich von Monoplex- versus Duplexformat im Sso-Mastermix mit und ohne Bacillus subtilis-DNA in verschiedenen Konzentrationen. Bacillus subtilis-DNA wurde direkt in die Mastermix-Ansätze eingegeben. Es wurden pro Ansatz immer Triplikate getestet. ....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 16. Vergleich von Monoplex- versus Duplexformat im GEX-Mastermix, mit und ohne Bacillus subtilis-DNA in verschiedenen Konzentrationen. Bacillus subtilis-DNA wurde direkt in die Mastermix-Ansätze eingegeben. Es wurden pro Ansatz immer 3 Replikate getestet. ....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 17. Einfluss auf die Cq-Werte von Bacillus subtilis bei diversen DNA-Konzentrationen von Aspergillus fumigatus im Duplexformat bei Sso- versus GEX-Mastermix. Es wurden immer 3 Replikate getestet. ....</i>	<i>73</i>

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1. Mastermix für PCR im Monoplexformat von Bacillus subtilis.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 2. Mastermix für PCR im Monoplexformat von Aspergillus fumigatus. ....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 3. Mastermix für PCR im Duplexformat für Aspergillus fumigatus und Bacillus subtilis.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 4. Mastermixzusammensetzung für die Verdünnungsreihen von Bacillus subtilis Primer 16S-S.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 5. Mastermixzusammensetzung für die Verdünnungsreihen von Bacillus subtilis Primer 16S-A. ....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 6. Darstellung der Cq-Werte, die mit 15000 Kopien Bacillus subtilis in wässriger Lösung und mit verschiedenen Mengen von Bacillus subtilis-Primer in der PCR mit 55 Zyklen gemessen wurden.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 7. Mastermixzusammensetzung für Verdünnungen von Bacillus subtilis Sonden 16S TM.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 8. Darstellung der Cq-Werte von diversen Mengen von Bacillus subtilis-Sonden bei 15000 Kopien Bacillus subtilis-DNA in wässriger Lösung in der PCR mit 55 Zyklen .....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 9. Mastermixzusammensetzung (Duplexformat) zur Testung der Interaktion von zwei verschiedenen Assays zum Nachweis von Aspergillus fumigatus und Bacillus subtilis.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 10. Vergleich der Testergebnisse von Monoplex- und Duplexformatmastermix. Die Mittelwerte wurden aus vier Versuchen mit dem Versuchsaufbau ermittelt. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 11. Ergebnisse bei der Testung von erstem und zweitem Eluat nach Aufbereitung von Humanserum unter Verwendung von Aspergillus fumigatus. „n.d.“ bedeutet „nicht detektiert“. 1 ml Humanserum wurde mit Aspergillus fumigatus DNA versetzt und danach aufbereitet. Am Ende der Aufbereitung wurde zweimal mit AVE-Puffer eluiert.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 12. Ergebnisse bei der Testung von erstem und zweitem Eluat unter Verwendung von Bacillus subtilis. „n.d.“ bedeutet „nicht detektiert“. 1 ml Humanserum wurde mit</i>	

*Bacillus subtilis* DNA versetzt und danach aufbereitet. Am Ende der Aufbereitung wurde der Filter zweimal mit AVE-Puffer eluiert. .... 48

Tabelle 13. Schematische Darstellung der Proben für die Real-time-PCR im Duplexformat. .... 63

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler und meinem Betreuer Dr. rer. nat. Jan Springer bedanken. Durch viel Geduld, jederzeit gute Ratschläge und hilfreiche Tipps sowie viel Zeit bei der abschließenden Korrektur meiner Arbeit haben sie diese möglich gemacht.

Weiter möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen und-mitarbeitern im Labor bedanken, die mir bei der Durchführung meiner Versuche immer mit einer helfenden Hand und einem guten Rat zur Seite standen.

Bedanken möchte ich auch bei Dr. med. Johanna Prunsche für die zahlreichen Blutspenden und guten Ratschläge für die Umsetzung und Gestaltung dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an Marita und Karl-Heinz Prunsche für die Unterstützung bei der Korrektur meiner Arbeit.

Abschließend möchte ich auch meinen Eltern Maria und Egon Rauer danken, die mich während Studium und Dissertation immer unterstützt haben.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Geburtsdatum

Geburtsort Albstadt

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand verheiratet

## Schulbildung

1985-1990 Schalksburgschule Grund- und Hauptschule, Albstadt- Ebingen

1990-1991 Ignaz- Demeter- Schule, Grund- und Hauptschule, Albstadt- Lautlingen

1991-1996 Schlossbergrealschule, Albstadt-Ebingen (Mittlere Reife)

1996-1999 Ausbildung zum Industrie- und Feinmechaniker

(FA: Groz- Beckert KG Albstadt)

(1999: Abschluss nach Lehrzeitverkürzung zum Industrie- und Feinwerkmechaniker)

1999-2000 Phillip-Matthäus-Hahn-Schule, Albstadt (technischen Fachhochschulreife)

2000-2001 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz als Rettungsanitäter

2001-2004 Kolpingkolleg, Ravensburg (Allgemeine Hochschulreife)

2004-2005 Ausbildung zum Rettungsassistenten

### Studium

WS 2005/2006-WS 2012/2013 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

02.04.2008 1. medizinisches Staatsexamen

02.11.2012 2. Medizinisches Staatsexamen

### Beruflicher Werdegang

27.11.2012 Approbation als Arzt

01.01.2013 Weiterbildungsassistent in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie Universitätsklinikum Würzburg

08.08.2018 Facharzt für Anästhesiologie an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie Universitätsklinikum Würzburg

Würzburg, 06.05.2019

Andreas Rauer