

Array-basierte Identifizierung humanpathogener Schimmel- und Hefepilze für die klinische Diagnostik

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart

zur Erlangung der Würde eines Doktors der

Naturwissenschaften (Dr. rer. nat) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Linda S. L. Mayer

aus Karlsruhe

Hauptberichter: apl. Prof. Dr. Steffen Rupp

Mitberichter: Prof. Dr. Roland Kontermann

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 2015

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie der

Universität Stuttgart

2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Abkürzungsverzeichnis	7
2 Zusammenfassung	9
Abstract	11
3 Einleitung	13
3.1 Sekundäre Pilzinfektionen durch humanpathogene Hefen und Schimmelpilze	13
3.2 Humanpathogene Hefen	14
3.2.1 <i>Candida</i> spp.	14
3.2.2 Humanpathogene Hefespezies der Sicherheitsstufe drei	18
3.2.3 Weitere humanpathogene Hefespezies	19
3.3 Humanpathogene filamentöse Pilze	20
3.3.1 Humanpathogene filamentöse Pilze der Sicherheitsstufe 3	21
3.3.2 Humanpathogene Dermatophyten	21
3.3.3 <i>Pneumocystis jirocevi</i> – ein Schlauchpilz, ohne Möglichkeit der laboratorischen Kultivierung	23
3.4 Diagnostik in klinischen Laboratorien	24
3.4.1 Kulturbasierte Diagnostik	24
3.4.2 Nicht-kulturbasierte Nachweismethoden	25
3.4.3 Molekulare Labordiagnostik	27
3.5 Identifikation humanpathogener Pilze mittels Mikroarray-Analyse	28
3.5.1 Hintergrundinformationen zu DNA-Mikroarrays	28
3.5.2 Stand der Technik der DNA-Mikroarrays in der klinischen Diagnostik	29
3.5.3 Einsatz von Lab-on-a-chip Systemen in der klinischen Diagnostik	31
3.6 Zielsetzung dieser Arbeit	32
4 Material und Methoden	33
4.1 Material	33
4.1.1 Chemikalien	33
4.1.2 Nährmedien	33
4.1.3 Puffer und Lösungen	34
4.1.4 Verbrauchsmaterial	34
4.1.5 Enzyme und Kits	35
4.1.6 Pilzspezies und Kultivierungsbedingungen	35

4.1.7	Bakterien und Kultivierungsbedingungen	36
4.1.8	Technisches Equipment	36
4.1.9	Software	37
4.1.10	Primer	37
4.2	Methoden	38
4.2.1	Anzucht von Hefen und filamentösen Pilzen	38
4.2.2	Kryokonservierung von Hefen	38
4.2.3	Kryokonservierung filamentöser Pilze	38
4.2.4	Isolierung genomischer DNA aus Hefen und filamentösen Pilzen	38
4.2.5	Bestimmung von Konzentration und Reinheit isolierter DNA	39
4.2.6	<i>E. coli</i> Transformation zur Gewinnung fungaler ITS-Regionen von <i>Pneumocystis jirevocii</i>	39
4.2.7	Amplifikation von Zielsequenzen mittels Polymerasekettenreaktion	40
4.2.8	Sequenzierung	44
4.2.9	Fluoreszenzmarkierte Primer für die Synthese fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte	45
4.2.10	Gelelektrophorese	46
4.2.11	Sondendesign	46
4.2.12	Hybridisierung fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte	48
4.2.13	Signaldetektion	49
4.2.14	Statistische Betrachtungen der Hybridisierungsergebnisse	50
5	Ergebnisse	51
5.1	Detektionsspektrum des DNA-Mikroarrays: Hefe- und Schimmelpilzspezies	51
5.1.1	Synonyme der 56 humanpathogenen Hefe- und Schimmelpilzspezies	52
5.2	Auswahl geeigneter Zielsequenzen für die Identifizierung fungaler Spezies	52
5.3	Etablierung eigener Datenbanken	53
5.4	Auswahl der ITS-Region als Zielregion für die Identifizierung	54
5.5	Etablierung von Polymerasekettenreaktionen mit ITS-Primern	55
5.5.1	Gradienten-PCR	55
5.5.2	Amplifikationstest mit humaner DNA	56
5.5.3	Vergleichsstudie von <i>Singleplex</i> - und <i>Multiplex-PCR</i>	56
5.6	Sensitivität durch <i>Nested-PCR</i>	60
5.6.1	Ergebnisse der <i>Nested-PCR</i> für Spezies innerhalb des Spacers ITS1	60
5.6.2	Ergebnisse der <i>Nested-PCR</i> für Spezies innerhalb des Spacers ITS2	65
5.7	Evaluierung des PCR-Array-Systems mit DNA von Referenzstämmen	70
5.7.1	Spezifische SONDENSIGNALE	72
5.7.2	Sonden mit Kreuzreaktivitäten	74
5.7.3	Coinfektionen	84
5.7.4	Ergebnisse der <i>Nested-PCR</i> verglichen mit den Ergebnissen von <i>Single</i> - und <i>Multiplex-PCR</i>	87
5.7.5	Statistische Betrachtung des finalen <i>PCR-Array-Systems</i>	92

5.8	Evaluierung des PCR-Array-Systems mit DNA von Patientenproben	93
5.8.1	Bestätigung des mikrobiologischen Befunds monomikrobieller Infektionen	94
5.8.2	Bestätigung des mikrobiologischen Befunds polymikrobieller Infektionen	96
5.8.3	Teilweise Erfassung der Pathogene mittels DNA-Mikroarray	103
5.8.4	Abweichende Resultate von Array-basierter und mikrobiologischer Identifizierung	105
6	Diskussion	107
6.1	<i>Internal transcribed spacer</i>-Region als Identifizierungsgrundlage	108
6.2	Etablierung und Vergleich unterschiedlicher PCR-Methoden	108
6.3	Sensitivität und Spezifität des entwickelten <i>PCR-Array-System</i>	110
6.3.1	<i>ITS-Nested-PCR</i>	110
6.3.2	Sensitivität des <i>PCR-Array-Systems</i>	110
6.3.3	Evaluierung und Spezifität des <i>PCR-Array-Systems</i>	111
6.3.4	<i>Zwei-Sonden-Diskriminierung</i> nah verwandter Spezies	113
6.3.5	Unspezifische PCR-Produkte und Kontaminationen	114
6.3.6	Signalintensitäten	115
6.4	Vergleich des entwickelten <i>PCR-Array-Systems</i> mit bestehenden Systemen	116
6.5	Signalverlagerung von Antisense- auf Sense-Sonden und umgekehrt	118
6.6	Evaluierung des etablierten <i>PCR-Array-Systems</i> mit DNA von Patientenproben	119
6.6.1	Array-basierte Bestätigung des mikrobiologischen Befundes	119
6.6.2	Abweichende Resultate von Array-basierter und mikrobiologischer Identifizierung	122
6.6.3	<i>Zwei-Sonden-Diskriminierung</i> bei der Evaluierung mit Patientenproben	123
6.7	Fazit und Ausblick	124
	Literaturverzeichnis	125
	Anhang	135
	Detektionsumfang des FYI-Chips	135
	Synonyme der 56 Hefe- und Schimmelpilzspezies	137
	Sequenzverfügbarkeit aller 56 Spezies und sechs Zielgene/-sequenzen	139
	Gespottete Sonden aller sechs Zielgene/-sequenzen	140
	Sonden des finalen Mikroarrays	150
	Primer für alle sechs Zielgene	152
	Ergebnisse der Vergleichsstudie von <i>Single-</i> und <i>Multiplex-PCR</i>	154
	Sensitivität durch <i>Nested-PCR</i>	161

Sondenevaluierung mit DNA von Patientenproben	173
Danksagung	175
Lebenslauf	177
Publikationen	179
Erklärung	181

1 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APAC	Asiatisch-Pazifisch
ATCC	American Type Culture Collection LGC Standards GmbH, Wesel, D
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BSI	Blutstrominfektionen
bspw.	beispielsweise
βtub	β-Tubulin
Bzw.	beziehungsweise
Ca.	circa
Cal	Calmodulin
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, CT Utrecht, Niederlande
CF	Zystische Fibrose
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
D	Deutschland
DB	Datenbank
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mik- roorganismen und Zellkulturen GmbH, Braun- schweig, D
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-3	Elongationsfaktor 3
esDNA	einzelsträngige DNA
EtOH	Ethanol
EU	Europa
FN	Falsch-negativ
FP	Falsch-positiv
Ggf.	gegebenenfalls
HCl	Chlorwasserstoff
HDZ	Herz- und Diabetes-Zentrum NRW
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
IGB	Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
LAM	Lateinamerika
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LOC	Lab-on-a-chip
LSU	Large ribosomal subunit
M	Molar
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption ionization time-of- flight mass spectrometry
MEP	Malzextraktpepton
MHK	Mittlere Hemmkonzentration
mind.	Mindestens
MS	Massenspektrometrie

Abkürzungsverzeichnis

NAM	Nordamerika
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
PCP	<i>Pneumocystis</i> -Pneumonie
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Potato dextrose agar (Kartoffel-Glucose-Agar)
PITYRO	Pityrosporummedium
PV-Wert	Positiver Vorhersagewert
rDNA	Ribosomale DNA
RN	Richtig-negativ
RP	Richtig-positiv
qPCR	Quantitative PCR
rpm	Runden pro Minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSU	small ribosomal subunit
Stabwn	Standardabweichung
TE	Tris-HCl +EDTA
Tmp	Temperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Typestrain
u.a.	Unter anderem
UPL	Universal Probe Library
Upm	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
var.	Variante (engl.)
YPD	Yeast peptone dextrose
YPE	Yeast peptone extract
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen für in dieser Arbeit genutzte Nukleotide gemäß IUPAC Nomenklatur

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
K	G oder T
M	A oder C
R	A oder G
Y	C oder T

2 Zusammenfassung

Die Zahl der invasiven Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten nahm in den letzten Jahren stetig zu. Betroffen sind u.a. Frühgeborene, Krebs- und AIDS-Patienten, Transplantierte sowie Mukoviszidose-Patienten. Zeitintensive Diagnostikmethoden in den klinischen Laboratorien können bei invasiven fungalen Infektionen zu hohen Mortalitätsraten der betroffenen Patienten führen. Diese Methoden beruhen auf Kultivierungen der Patientenproben sowie morphologischen und physiologischen Tests. Empirische Therapien ohne klare Diagnose bergen neben Unwirksamkeiten und Resistenzentwicklungen auch die Gefahr massiver Nebenwirkungen, die den Zustand der Patienten verschlechtern können. Bei fungalen Infektionen kann die Kultivierungszeit der Patientenproben bis zu einem eindeutig positiven oder negativen Ergebnis, Tage und sogar Wochen in Anspruch nehmen. Durch eine zeitnahe und adäquate Medikation infolge einer schnellen und speziesspezifischen Identifizierung direkt aus der Patientenprobe könnte die Lebenserwartung der Patienten erhöht werden. Dies bedarf einer sensitiven Identifizierungsmethode, die selbst sehr geringe Zellzahlen auf Speziesebeben nachzuweisen vermag.

In dieser Arbeit wurde ein *PCR-Array-System* basierend auf konservierten und variablen Sequenzen der *Internal transcribed spacer* Region des ribosomalen Clusters für den Nachweis humanpathogener Pilze etabliert. Durch den Einsatz panfungalier Primer in der etablierten *ITS-Nested-PCR* konnte eine Mindestmenge von zehn fungalen DNA-Molekülen bei hohem humanem DNA-Hintergrund zuverlässig amplifiziert werden. Von insgesamt 566 entwickelten DNA-Oligonukleotid-Sonden wurden 96 ITS-Sonden ausgewählt. Diese erlaubten eine simultane Überprüfung der amplifizierten ITS-Region auf 56 humanpathogene fungale Spezies.

Das etablierte finale *PCR-Array-System* wurde mit fungaler Referenz-DNA bei humanem DNA-Hintergrund evaluiert. Bei 64 % der hybridisierten Spezies waren ausschließlich Signale auf den zugehörigen 30 Antisense-Sonden für diese Spezies zu verzeichnen. 36% der hybridisierten Spezies führten neben speziesspezifischen Signalen zudem zu Signalen auf Sonden, die nicht der hybridisierten Spezies zuzuordnen waren. Allerdings wiesen die unspezifischen Sondersignale hauptsächlich Intensitäten nahe des Detektionsschwellenwertes auf. Die statistische Bewertung des *PCR-Array-Systems* wies eine Richtig-Positiv-Rate von 100 % und eine Richtig-Negativ-Rate von 99 % für Einzelspezies-Hybridisierungen auf. Durch eine *Zwei-Sonden-Diskriminierung*, die bei monomikrobiellen Infektionen herangezogen werden könnte, ist bei diesen Spezies jedoch eine eindeutige Diskriminierung möglich. Die Evaluierung des Systems mit DNA aus Trachealsekreten und Bronchoalveolären Lavages zeigte, dass diese Unspezifitäten Spezies betraf, die für das untersuchte Probenmaterial klinisch weniger relevant waren wie bspw. Dermatophyten. Klinisch für die untersuchten Probenmaterialien relevantere Spezies wie *Candida albicans* und Nicht-*albicans Candida* Spezies konnten anhand spezifischer Sonden eindeutig identifiziert werden, wobei im Fall von Nicht-*albicans Candida* Spezies eine spezifischere Klassifizierung möglich war, als durch in der klinischen Diagnostik aktuell angewandte mikrobiologische Methoden. Bei 102 Patientenproben - Trachealsekreten und Bronchoalveolären Lavages – stimmte das Ergebnis des *PCR-Array-Systems* mit den mikrobiologischen Be-

funden überein. Für 23 Proben konnte der mikrobiologische Befund durch die Ergebnisse des Systems erweitert werden. Bei weiteren 23 Proben wurden, mittels des entwickelten *PCR-Array-Systems*, weniger Spezies als durch mikrobiologische Methoden identifiziert. Lediglich bei drei Proben wurden komplett abweichende Array-Befunde erzielt.

Beginnend mit der DNA-Isolierung der Patientenproben ist durch das in dieser Arbeit etablierte *PCR-Array-System* eine speziesspezifische Identifizierung und adäquate Medikation der Patienten innerhalb weniger Stunden realisierbar und würde zu einer erhöhten Überlebenschance dieser beitragen.

Abstract

The number of invasive fungal infections of immunocompromised patients increased steadily in recent years. Neonates, cancer and AIDS patients, transplant and cystic fibrosis patients are most commonly affected. Due to time-consuming diagnostic methods in clinical laboratories invasive fungal infections are associated with high mortality rates. These methods are based on morphological and physiological tests of cultivated patient samples. This identification process can take a few days up to several weeks, which mandates empirical therapies to be conducted. This can lead to inefficient therapy, the development of resistance to antimycotics and the risk of massive side effects resulting in a worsened health situation of the patients. Through a species-specific, timely and adequate medication the patient's life expectancy can be increased significantly. This, however, requires a sensitive identification method which allows the detection and identification of even a small number of fungal cells at the species level.

In this study, a *PCR-Array-System* based on conserved and variable sequences of the *internal transcribed spacer* region of the ribosomal cluster for the detection of human pathogenic fungi is developed. By using panfungal primers for the amplification of the fungal ITS region via a *Nested-PCR* approach, a minimum of ten fungal DNA molecules within a high human DNA background could be amplified reliably. For identification, 96 ITS oligonucleotide probes were shown to be most discriminating out of a total of 556 developed DNA oligonucleotide probes. This DNA microarray allows the simultaneous screening of the amplified ITS regions on 56 human pathogenic fungal species.

The established *PCR-Array-System* was evaluated with fungal reference DNA samples within a human DNA background situation. For 64 % of the hybridized species signals could be identified by a single probe reaction. For 36 % of the hybridized species, species-specific signals could be observed next to signals that were not matching the hybridized species. However, those non-specific probe signals showed mainly intensities close to the detection threshold. For monomicrobial infections, a clear discrimination is still possible by a *double-probe-discrimination*. The statistical evaluation of the final *PCR-Array-System* had a true positive rate of 100 % and a specificity of 99 % for single-species hybridizations. The evaluation of the *PCR-Array-System* with DNA from tracheal secretions and bronchoalveolar lavages has shown that these unspecific signals relate to species that are clinically less relevant for the applied probe material like dermatophytes. Clinically relevant species such as *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species could be clearly identified using the specific probes established in this work. Even for non-*albicans Candida* species a more specific classification compared to currently applied microbiological methods in clinics is possible. The results of the *PCR-Array-Systems* of 53 of 102 patient samples – tracheal secretion and bronchoalveolar lavages – concur with the results of the microbiological results. For 23 samples the microbiological results could be extended via the established *PCR-Array-Systems* and also for 23 samples less species than with microbiological methods could be identified. Only three samples showed completely different results.

Starting with the isolation of DNA of the patient samples a species-specific identification and adequate medication within a few hours can be realized by the *PCR-Array-System* established in this work. This would result in an increased life expectancy of the patient.

3 Einleitung

3.1 Sekundäre Pilzinfektionen durch humanpathogene Hefen und Schimmelpilze

Sekundäre Pilzinfektionen stellen ein zunehmendes gesundheitliches Risiko für immunsupprimierte Patienten dar. Gefährdet und anfällig für fungale Infektionen sind unter anderem Frühgeborene, deren Immunsystem noch nicht vollständig entwickelt und adaptiert ist, sowie Menschen fortgeschrittenen Alters, die mit Problemen wie Immunoseneszenz zu kämpfen haben. Krebspatienten und Menschen, die an dem *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) leiden, stellen ebenfalls eine Risikogruppe für Infektionen mit humanpathogenen Pilzen dar. Das Immunsystem dieser Patienten ist durch chemotherapeutische Medikation oder durch die Primärinfektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus geschwächt. Intensivpatienten, die bewusst immunsupprimierend medikamentiert werden, um eine Abstoßungsreaktion auf das transplantierte Organ zu unterbinden, gelten ebenfalls als stark gefährdet für die Infektion mit humanpathogenen Pilzen. Patienten mit zystischer Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, stellen die vierte Risikogruppe für sekundäre Pilzinfektionen dar. Bei dieser Primärerkrankung sezernieren exokrine Drüsen ein sehr viskoses Sekret, das in der Lunge Nährgrundlage für humanpathogene Pilze bietet (Lindemann und Ballmann, 2004).

Die Zahl der eukaryotischen, fungalen Infektionen nahm in den vergangenen Jahren stetig zu. Laut einer Studie aus dem Jahre 2001 war zudem eine erhöhte Mortalität durch diverse Mykosen während der Jahre 1980 bis 1997 festzustellen: waren es zu Beginn der Studie noch 1.567 Tote, verstarben im letzten Jahr der Aufzeichnung 6.534 Patienten infolge von Infektionen mit humanpathogenen Pilzen (McNeil *et al.*, 2001). Darunter zählen Infektionen der Haut und Schleimhäute sowie innerer Organe, wobei invasive Pilzinfektionen die Hauptursache für eine hohe Morbidität und Mortalität bei den genannten Risikogruppen darstellen (Ascioglu *et al.*, 2002). Demnach versterben Patienten nicht aufgrund ihrer Primärinfektion bzw. Primärerkrankung, sondern infolge einer Infektion mit eukaryotischen sekundären Krankheitserregern. Diese können auch nosokomialen Ursprungs sein. Laut einer europäischen Studie zur Häufigkeit nosokomialen Infektionen auf Intensivstationen stehen Pilze auf Platz fünf. Neben bakteriellen Erregern, wie Enterobakterien, *Pseudomona aeruginosa* oder Staphylococcen machen fungale Pathogene 17% der nosokomialen Infektionen aus (Vincent *et al.*, 1995).

3.2 Humanpathogene Hefen

Humanpathogene Pilze können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Hefen und filamentöse Pilze, die sogenannten Schimmelpilze. Hefen sind einzellige Organismen, die sich asexuell durch Knospung und Spaltung, oder sexuell, jedoch ohne Ausbildung sexueller Fruchtkörper, vermehren. Unterteilen lassen sich Hefen in Schlauchpilze, genannt *Ascomycota* und Ständerpilze, die sogenannten *Basidiomycota* (Kurtzman *et al.*, 2011). Im Folgenden werden humanpathogene Hefe- und Schimmelpilzspezies näher veranschaulicht, die mittels des in dieser Arbeit etablierten *PCR-Array-Systems* identifiziert werden sollen.

3.2.1 *Candida* spp.

Unter dem Genus *Candida* werden imperfekte Hefespezies zusammengefasst, die hauptsächlich asexuelle Verbreitungsformen aufweisen. Jedoch gibt es darunter auch Spezies, die sich sexuell vermehren und demnach zwei Genera angehören (Barns *et al.*, 1991). *Candida famata* beispielsweise kann sich sowohl asexuell (anamorphe Spezies) als auch sexuell (teleomorphe Spezies) vermehren, wobei die teleomorphe Spezies unter dem Synonym *Debaryomyces hansenii* bekannt ist. *Candida* spp. besiedeln Haut und Schleimhäute von 20-50 % der gesunden Bevölkerung. Hierbei handelt es sich um eine Kolonisierung mit geringen Zellzahlen und nicht um eine Pilz-Infektion (Ruhnke, 2007). Bei immunsupprimierten Patienten, wie beispielsweise AIDS-Patienten, sind mukokutane Candidosen, die sich in oropharyngeale und vaginale Candidosen unterteilen lassen, weit verbreitet (vgl. Abbildung 1). Hierbei geht die Zellzahl, veranlasst durch ein geschwächtes Immunsystem, über eine Kolonisierung hinaus.

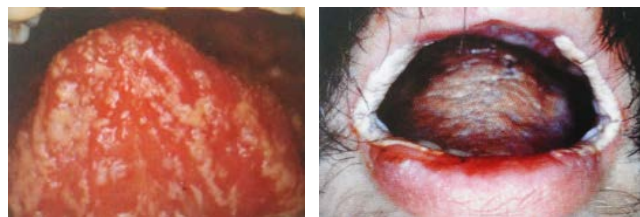


Abbildung 1: Candidosen bei AIDS-Patienten. Links: Fluconazol-refraktäre orale Candidose an der Zunge. Rechts: Hyperplastische Fluconazol-resistente Candidose der gesamten Mundschleimhaut einschließlich der Mundwinkel (Ruhnke, 2007, modifiziert).

Neben harmlosen Kolonisierungen mit *Candida* Spezies, sind diese ebenso für rund 80% aller nosokomialer Pilzinfektionen verantwortlich und gehören zu den am häufigsten kultivierten Mikroorganismen auf klinischen Intensivstationen (El-Ebiary *et al.*, 1997). Sie stellen die vierthäufigste Ursache von Blutstrominfektionen (BSI) dar und tragen zu einem verlängerten Krankenhausaufenthalt mit erhöhter Mortalität und Morbidität der Patienten bei (Fernandez *et al.*, 2009). Die Mortalitätsrate solcher BSI, die durch *Candida* spp. verursacht werden, liegt bei rund 50% (Ahmad *et al.*, 2002).

In klinischen Isolaten werden je nach geographischem Raum unterschiedliche *Candida* Spezies identifiziert. Die Häufigkeit von *C. albicans* Infektionen liegt dabei bei den betrachteten geografischen Räumen bei ca. 50%. Die prozentuale Verteilung von *C. glabrata* schwankt dagegen sehr. Im asiatisch-pazifischen Raum liegt diese bei 8,46 %, in Nordamerika ist dagegen eine dreifach höhere Infektionsrate zu verzeichnen (vgl. Abbildung 2).

<i>Candida</i> species	APAC	LAM	EU	NAM	Total
<i>C. albicans</i>	57.10	47.93	58.42	50.03	53.67
<i>C. parapsilosis</i>	15.97	18.62	10.63	14.04	14.20
<i>C. glabrata</i>	8.46	5.67	13.93	23.77	13.97
<i>C. tropicalis</i>	14.20	19.96	8.56	7.66	11.69
<i>C. krusei</i>	0.94	1.62	4.87	1.48	2.54
<i>C. guilliermondii</i>	0.73	3.60	0.50	0.34	1.14
<i>C. lusitaniae</i>	0.63	0.63	1.29	1.48	1.08
<i>C. kefyr</i>	0.10	0.63	1.23	0.47	0.69
<i>C. famata</i>	0.84	0.72	0.22	0.27	0.45
<i>Candida</i> spp. ^b	1.04	0.63	0.34	0.47	0.56

Abbildung 2: Prozentuale geografische Verteilung diverser *Candida* Isolate. ^a APAC: Asiatisch-Pazifisch, LAM: Lateinamerika, EU: Europa, NAM: Nordamerika. ^b *Candida* spp. inkludiert u. a. *C. dubliniensis* (6 Isolate) (Pfaller et al., 2008, modifiziert).

Candida spp. werden auch in der Lunge von Patienten gefunden. Untersuchungen mikrobiologischer Kulturen des Sputums von Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) beispielsweise zeigten, dass 9,5 % der untersuchten Proben eine Infektion mit *Candida* spp. aufwiesen (Karnak et al., 2001). Eine weitere Studie zur Untersuchung von Sputumproben auf chronisch candidale Bronchitis zeigte, dass von elf untersuchten Patienten acht eine Infektion mit *C. albicans*, zwei eine Infektion mit *C. glabrata* bzw. *C. krusei* aufwiesen. Je ein Patient zeigte eine Infektion mit *C. tropicalis* bzw. *C. parapsilosis* (Johnson, 2012).

Die zu den *fungi imperfecti* gehörende *Candida* Spezies *C. albicans* (Gillum et al., 1984) stellt den klinisch relevantesten Vertreter der humanpathogenen Hefen dar. Möglicherweise aufgrund der Tatsache, dass diese *Candida* Spezies in der Lage ist verschiedene Morphologien anzunehmen und unter unterschiedlichsten Bedingungen zu wachsen. Rundes, einzelliges Wachstum wird als Blastospore oder allgemein als Hefewachstum bezeichnet. Tochterzellen entstehen durch Knospung an der Mutterzelle und separieren sich nach erfolgreicher Zellteilung voneinander (Sudbery, 2001). Langgezogene, aneinander gereihte Einzelzellen, sogenannte Pseudohyphen sind ebenfalls bekannt für *Candida albicans*. Neben dem pseudohyphalen Wachstum existiert zudem echtes Hyphenwachstum. Hierbei handelt es sich um lange und verzweigte Myzelfäden, bei denen einzelne Zellen, mit je einem Zellkern, durch Septierungen voneinander getrennt sind. Diese morphologische Plastizität gilt als wichtiger Faktor während des Infektionsprozesses (Lo et al., 1997). *C. albicans* kolonisiert unter anderem die Haut und Schleimhäute als auch den Gastroin-

testinaltrakt gesunder Menschen (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Bei immunsupprimierten Patienten kann dies zu schwerwiegenden Infektionen führen. Bis zu 90 % der HIV-Patienten leiden an Candidose, verursacht durch die Infektion mit *C. albicans* (Xu *et al.*, 2000). Bei CF-Patienten ist *C. albicans* für 95 % der *Candida*-Infektionen verantwortlich (Chotirmall *et al.*, 2010). Neben Infektionen von Haut und Schleimhäuten, sowie der Lunge, spielt *C. albicans* auch eine Rolle bei systemischen Infektionen. Mit mehr als 45 %-iger Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei einer, durch humanpathogene Pilze verursachte, BSI um den Erreger *C. albicans* (Fernandez *et al.*, 2009).

Nicht-*albicans Candida* Spezies wie *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* oder *C. tropicalis* stellen nach *C. albicans* weitere klinisch relevante Spezies dar. *C. glabrata*, auch unter dem Namen *Torulopsis glabrata* bekannt, gehört zu den entfernteren Verwandten von *C. albicans* (vgl. Abbildung 3). Dennoch ist *C. glabrata* in den Vereinigten Staaten die zweithäufigste für BSI verantwortliche Spezies (Pfaller *et al.*, 2001) und zeigt somit ein hohes Pathogenpotenzial.

Nahverwandte Spezies von *C. albicans* sind *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* (vgl. Abbildung 3). *C. parapsilosis* kann Infektionen bei Neugeborenen und Transplantationsempfängern hervorrufen, wohingegen *C. tropicalis* bei Krankheitsbildern wie Neutropenie, der Verminderung neutrophiler Granulozyten im Blut, oder bei malignen Tumoren auftritt (Butler *et al.*, 2009).

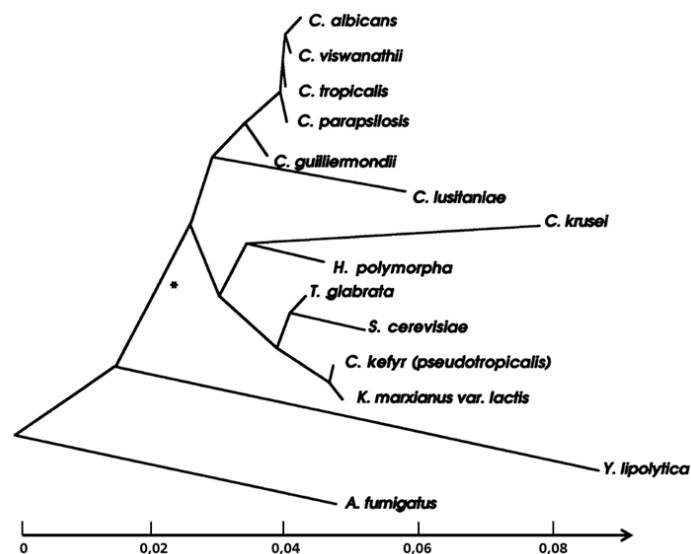


Abbildung 3: Evolutionärer Stammbaum des Genus *Candida* und verwandte Spezies. Der Pfeil verdeutlicht die evolutionäre Distanz der Spezies (Barns *et al.*, 1991, modifiziert).

Weitere *Candida* spp. wie *C. guilliermondii*, *C. krusei* und *C. lusitaniae* können für weniger als 5 % der invasiven Candidosen verantwortlich gemacht werden (Butler *et al.*, 2009). Auch Mukoviszidose-Patienten können mit Nicht-*albicans* *Candida* Spezies wie *C. glabrata* und *C. parapsilosis* infiziert sein. Lediglich 5 % der *Candida*-Infektionen sind hierbei auf die genannten Spezies zurückzuführen (Chotirmall *et al.*, 2010).

Candida dubliniensis ist eine mit *C. albicans* sehr nahverwandte Spezies. Sie wurde 1995 als neue Spezies in Dublin, Irland, beschrieben (Sullivan *et al.*, 1999) und konnte einer Studie aus dem Jahr 1997 zufolge mit zunehmender Häufigkeit in den Mundhöhlen von AIDS-Patienten gefunden werden (Coleman *et al.*, 1997). Demnach spielt *C. dubliniensis* trotz naher Verwandtschaft eine *C. albicans*-untergeordnete Rolle in der klinischen Manifestation.

Laut einer internationalen Studie, in der Blutstrominfektionen untersucht wurden, konnten lediglich zwei Prozent der Infektionen auf *Candida famata* zurückgeführt werden (Pfaller *et al.*, 1999). *C. famata* ist auch unter dem Synonym *Debaryomyces hansenii* bekannt. Dieses stellt die teleomorphe Form der Hefe dar.

Candida parapsilosis gilt nach *Candida albicans* als zeithäufigste *Candida* Spezies, die als Ursache für Blutstrominfektionen insbesondere in Lateinamerika identifiziert wurde (Lockhart *et al.*, 2008). Früher wurde *C. parapsilosis* in drei Gruppen eingeteilt: *C. parapsilosis* Gruppe I, Gruppe II und Gruppe III. Im Jahre 2005 wurden DNA-Sequenzen der drei Gruppen analysiert und Unterschiede in verschiedenen Genen untersucht. Diese Unterschiede waren nicht geringfügig und ließen berechnete Zweifel an der Bezeichnung *Subspezies* für diese drei Untergruppen von *C. parapsilosis* zu. Abgrenzend zu dieser Spezies wurden die Speziesnamen *C. metapsilosis* und *C. orthopsilosis* anstelle der Bezeichnung *C. parapsilosis* Gruppe II und Gruppe III eingeführt (Tavanti *et al.*, 2005). Ein weiterer interessanter Hinweis, welcher die Differenzierung der drei *C. parapsilosis* Gruppen in verschiedene Spezies bekräftigt, stellt die Gegenüberstellung der Wirksamkeit von Antimykotika dieser drei Spezies dar. Lockhart *et al.* zeigten 2008 die unterschiedlichen mittleren Hemmkonzentrationen (MHK) der gängigen klinisch verabreichten Antimykotika Fluconazol, Amphotericin B und Caspofungin für *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* und *C. orthopsilosis* (Lockhart *et al.*, 2008). Während *C. orthopsilosis*-Isolate bei einer geringeren Caspofungin-Konzentration empfindlich reagierten, zeigten *C. parapsilosis*-Isolate erst ab der doppelten Konzentration von 0,25 µg/ml Caspofungin eine Reaktion (vgl. Abbildung 4).

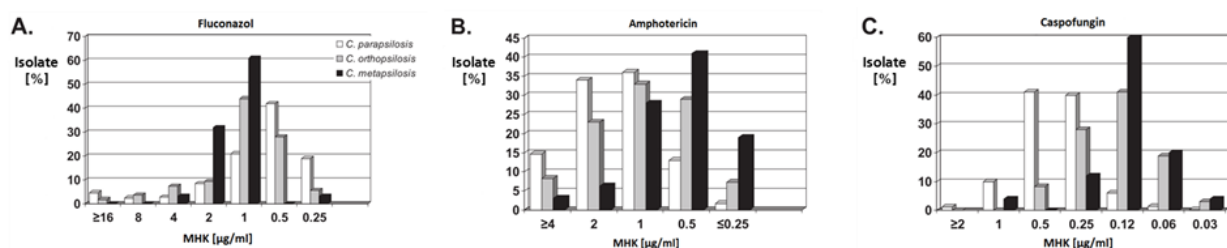


Abbildung 4: Darstellung der Mittleren Hemmkonzentration von *Candida* spp. MHK der Spezies *C. parapsilosis* (weiß), *C. orthopsilosis* (grau) und *C. metapsilosis* (schwarz) für die gängigen Antimykotika Fluconazol (A), AmphotericinB (B) und Caspofungin (C) (Lockhart *et al.*, 2008, modifiziert).

Die humanpathogene Spezies *Candida kefyr* gilt unter anderem als Lebensmittel-Kontaminante. Sie wurde bereits von Camembert-Käse isoliert, der in Australien produziert wurde (Roostita und Fleet, 1996). Während *Candida albicans* 53,67 % der klinisch isolierten *Candida* Spezies ausmacht, werden *C. kefyr* lediglich 0,69 % zugeschrieben (Pfaller *et al.*, 2008). Aus einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2005 geht hervor, dass drei Patienten mit neutropenischer Leukämie nach der Transplantation von Stammzellen und/oder nach chemotherapeutischen Behandlung an eine Blutstrominfektion mit *C. kefyr* litten. Interessanterweise konnten zwei der drei Infektion auf die Ernährungsgewohnheiten der Patienten zurückgeführt werden. Diese Patienten ernährten sich unter anderem von diversen Milchprodukten, die *C. kefyr* enthielten (Reuter *et al.*, 2005).

Candida pulcherrima - heutzutage bekannt unter *Metschnikowia pulcherrima* - ist geografisch weit verbreitet und gilt typischerweise als Kontaminante von vegetarischem Material wie Früchten und Blumen (Kennedy *et al.*, 1972). Die Erstbezeichnung der Spezies *Candida pulcherrima* fand 1901 statt. Der Name „*pulcherrima*“ ist dabei auf Aussehen der kugelförmigen Zellen zurückzuführen, wodurch sich die Spezies von anderen Hefen unterscheidet (Lodder und Kreger-van Rij, 1952). Obwohl *C. pulcherrima* weitläufig als apathogene Spezies gilt, konnte diese bei Patienten mit Onychomykose isoliert und nachgewiesen werden (Pospisil, 1989).

3.2.2 Humanpathogene Hefespezies der Sicherheitsstufe drei

Die humanpathogene dimorphe Hefe *Coccidioides immitis* ist hauptsächlich in Zentral- und Südamerika, Mexiko und Südwesten der Vereinigten Staaten vertreten. *Coccidioides posadasii* wurde früher aus geographischen Gründen nicht als eigenständige, sondern vielmehr als nicht-Kalifornische *Coccidioides immitis* Spezies angesehen. Phylogenetische Mikrosatelliten-Analysen konnten diese differentielle Benennung der *Coccidioides* Spezies untermauern (Fisher *et al.*, 2002). Coccidioidomykosen bei Menschen resultieren aus der Inhalation von Sporen aus der Umwelt und resultieren – oft unter Ausbildung von Myzelien – in einer pulmonalen Erkrankung (Neafsey *et al.*, 2010). Die Spezies *C. immitis* und *C. posadasii* gehören der Sicherheitsstufe drei an und können selbst bei gesunden Menschen Infektionen hervorrufen.

Eine weitere Hefe, die der Sicherheitsstufe drei zugeordnet wird, ist *Paracoccidioides brasiliensis*. Als mögliche Ursache für Paracoccidioidomykosen spielt diese Spezies in Lateinamerika eine klinisch relevante Rolle.

Weitere dieser Sicherheitsstufe zugehörige Spezies sind *Histoplasma capsulatum* und *Blastomyces dermatitidis*. Ähnlich wie *C. albicans* sind diese Spezies in der Lage ihre Morphologie zu ändern. Das bedeutet sie wechseln aus einem einzel- bis multizellulären in ein filamentöses Wachstumsstadium (San-Blas *et al.*, 2002).

3.2.3 Weitere humanpathogene Hefespezies

Die morphologische Transition von hefeartigem zu filamentösem Wachstum wird auch bei der Spezies *Sporothrix schenckii* beobachtet. Dieses tritt sowohl bei differentieller Kultivierung auf verschiedenen Nährböden bei unterschiedlichen Temperaturen, als auch in Patienten, die mit *S. schenckii* infiziert sind, auf (de Lima Barros *et al.*, 2011). *S. schenckii*-Infektionen sind weltweit bekannt, jedoch in tropischen wie subtropischen Gebieten weiter verbreitet (Marimon *et al.*, 2006).

Allgegenwärtig scheint die humanpathogene Hefespezies *Rhodotorula minuta*. Spezies der Gattung *Rhodotorula* kommen in Luft, Wasser, Erde sowie auf der Haut und im Gastrointestinaltrakt vor (Goldani *et al.*, 1995). *Rhodotorula* spp. konnten auch von Duschvorhängen, Badewannenfugen und Zahnbürsten isoliert werden. *Rhodotorula minuta* zeigt rosa-orange kolorierte Kolonien und ist auf der Haut zu finden (Galán-Sánchez *et al.*, 1999).

Saccharomyces cerevisiae ist allseits als Bäckerhefe in der Lebensmittelindustrie bekannt (Muñoz *et al.*, 2005), findet allerdings auch als Probiotikum für Antibiotika-assoziierte Diarrhöe Verwendung. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es nach der Verabreichung von *S. cerevisiae* als Probiotikum vereinzelt zu diversen Formen invasiver Infektionen mit dieser Spezies kam (Muñoz *et al.*, 2005).

Weit weniger bekannt in Deutschland sind die für Cryptococcosis verantwortliche Spezies *Cryptococcus gattii* und *Cryptococcus neoformans*. 1999 wurde auf Vancouver Island ein Ausbruch mit *C. gattii* registriert. Diese sich endemisch entwickelnde Infektionswelle betraf Mensch und Tier mit einer hohen Infektionsrate selbst bei gesunden Patienten (Byrnes *et al.*, 2009a). Oft wird *C. gattii* auch mit subtropischen und tropischen Klimata, wie es in Australien und Südamerika vorkommt, in Verbindung gebracht (Byrnes *et al.*, 2009b) und ist in der Lage selbst immunkompetente Wirte zu infizieren (Byrnes *et al.*, 2009a). *Cryptococcus neoformans*, welcher in immunsupprimierten Patienten fungale Meningitis verursacht, ist hingegen geographisch nicht eingeschränkt. Beide *Cryptococcus* spp. verfügen über eine Polysaccharid-Kapsel und können aufgrund antigener Determinanten weiter unterschieden werden: *C. gattii* verfügt über die Serotypen B und C (Datta *et al.*, 2009) während *C. neoformans* über die Serotypen A und D verfügt, was zu einer Neubenennung der Spezies in *C. neoformans* var. *neoformans* (Serotyp D) und *C. neoformans* var. *grubii* (Serotyp A) führte (Doering, 2000).

3.3 Humanpathogene filamentöse Pilze

Eine ebenfalls wichtige klinische Rolle spielen neben aufgeführten humanpathogenen Hefepilzen filamentöse Pilze - die sogenannten Schimmelpilze. Transplantationsempfänger und Patienten, die infolge einer AIDS-Erkrankung oder chemotherapeutischen Behandlung immunsupprimiert sind, stellen repräsentative Risikogruppen dar. Ebenso können Mukoviszidose-Patienten betroffen sein. Hintergrund dieser genetischen Krankheit, die kaukasische Menschen betrifft, ist eine Störung des Elektrolyte- und Flüssigkeitstransports (Quinton, 1983). Dabei auftretendes zähflüssiges Sekret in der Lunge dient Mikroorganismen als Nährboden. Tagtäglich atmen Menschen Sporen aus der Umwelt ein wie bspw. Sporen des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*. Sowohl innerhalb als auch außerhalb von geschlossenen Räumen können 1-100 Konidien pro Kubikmeter gezählt werden (Latgé, 2001). Bei gesunden Menschen stellt dies kein gesundheitliches Risiko dar, wohingegen beispielsweise Patienten mit Zystischer Fibrose an einer invasiven Aspergillose erkranken können. Aufgrund der steigenden Zahl immungeschwächter Patienten in den letzten 20 Jahren und durch die Zunahme immunsupprimierender Behandlungsmethoden stellt *Aspergillus fumigatus* heutzutage das am weitesten durch die Luft verbreitete pilzliche Pathogen dar. Eingeatmete Sporen gelangen in die Lungenalveolen, keimen dort aus und verzweigen sich. Diese septierten Myzelien durchdringen das Lungengewebe und scheiden Proteine aus, die weiteres Myzelienwachstum in das Lungenparenchym anregen (Latgé, 2001). Es sind weitere klinisch relevante *Aspergillus* Spezies bekannt, die mit Onychomykosen in Verbindung gebracht werden: *A. niger* und *A. flavus*. Diese Spezies konnten von Fuß- und Fingernägeln isoliert werden (RAMANI *et al.*, 1993).

Neben Lungen-assoziierten *Aspergillo*sen sind pulmonale und rhinocerebrale Mucor- und Zygomycosen von klinischer Bedeutung. Mucormykose ist die zweithäufigste durch filamentöse Pilze verursachte Krankheit (Hoffmann *et al.*, 2007). Sie wird von Pilzen der Ordnung Mucorales hervorgerufen, zu denen *Mucor* Spezies, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae* sowie *Absidia corymbifera* gehören (Spellberg *et al.*, 2005). Klinisch relevante *Mucor* spp. sind *M. hiemalis*, *M. plumbeus* und *M. racemosus*. *Rhizopus oryzae* stellt unter den *Rhizopus* spp. die verbreitetste Spezies dar; sie kann für 90 % der invasiven Zygomycosen verantwortlich gemacht werden. *R. stolonifer* stellt ebenfalls einen Erreger von Zygomycosen dar (Chakrabarti *et al.*, 2010). *Absidia* spp. sind omnipräsente Bodenbewohner, die Mensch und Tier befallen und Mukormycosen auslösen können. Betroffen sind hierbei meist neutropenische Patienten (Hoffmann *et al.*, 2007). Zu dem Genus *Absidia* gehören unter anderen die Spezies *A. caerulea*, *A. cylindrospora*, *A. glauca* und *A. spinosa*. Aufgrund physiologischer und morphologischer Analysen wurde die Spezies *A. corymbifera* der Familie *Lichtheimiaceae* zugeordnet und wurde demnach in *Lichtheimia corymbifera* umbenannt (Woo *et al.*, 2012).

Fusarium Spezies sind bekannt als Saprophyten in Böden sowie als Pflanzenpathogene (Godoy *et al.*, 2004), wie beispielsweise *Fusarium solani*, ein Pflanzenpathogen, das – wie der Name vorausschickt – Kartoffeln befällt. *F. solani* ist neben anderen *Fusarium* spp. jedoch auch ein humanpathogener filamentöser Pilz. Infektionen beschränken sich meist auf oberflächliche Mykosen. Aufgrund der Nähe zum Erdboden beim Tragen offener Schuhe oder durch den Kontakt mit den Erregern in Schwimmbecken sind oft-

mals die Nägel der Patienten befallen (Godoy *et al.*, 2004). Bei immunsupprimierten Patienten hingegen kann die Infektion in tiefere Gewebe vordringen.

In Südost-Asien ist ein weiterer humanpathogener Schimmelpilz weit verbreitet. Infektionen mit *Penicillium marneffe* spielen in diesem geografischen Raum bei HIV-Patienten eine bedeutende Rolle. Selbst nach erfolgreicher Primärtherapie, liegt die Rückfallrate bei dieser Spezies bei ca. 50 % (Supparatpinyo *et al.*, 1998).

3.3.1 Humanpathogene filamentöse Pilze der Sicherheitsstufe 3

Neben humanpathogenen Hefen der Sicherheitsstufe drei (vgl. 3.2.2) existieren zudem filamentöse Pilze, die gleichermaßen eingestuft werden und immunkompetente Menschen infizieren können. *Pseudallescheria boydii* ist eine solche humanpathogene Spezies. Sie ist auch unter ihrem anamorphen Namen *Scedosporium apiospermum* bekannt. Das zugehörige Krankheitsbild trägt den Namen Scedosporiosis und ist, aufgrund der ungeklärten Behandlungsmethodik, mit einer hohen Mortalitätsrate assoziiert (Gilgado *et al.*, 2005).

3.3.2 Humanpathogene Dermatophyten

1934 fasste Emmons die Genera *Microsporum*, *Trichophyton* und *Epidermophyton*, um nur die anamorphen Genera zu nennen, unter dem Begriff Dermatophyten zusammen (Emmons, 1934) (vgl. Abbildung 5). Unter Dermatophyten werden jene nahverwandte Pilze verstanden, die über die Fähigkeit verfügen, in verhorntes Gewebe, wie Haare, Haut und Nägel einzudringen (Weitzman und Summerbell, 1995). *Epidermophyton* spp. bilden als einzige Gattung unter den Dermatophyten Mikrokonidien aus und grenzen sich dadurch von *Microsporum* und *Trichosporon* Spezies ab (Kano *et al.*, 1999). Zu der Gattung *Microsporum* gehören unter anderem *M. gypseum* und *M. canis*. *M. gypseum* löst sowohl Entzündungen auf haarloser Haut als auch der Kopfhaut aus (Porro *et al.*, 1997). *M. canis* hingegen wurde als Ursache für die Hautkrankheiten Tinea Capitis und Tinea Corporis beschrieben. Dies konnte durch Isolierung der Spezies von betroffenen Hautstellen des Patienten festgestellt werden. Die Übertragung der Spezies fand wahrscheinlich durch infizierte Tiere, die kutanen Läsionen aufwiesen, statt (Cafarchia *et al.*, 2006). *Trichophyton* Spezies stellen die dritte Gattung der Dermatophyten dar und sind neben *Microsporum* spp. ebenfalls verantwortlich für die Hautkrankheit Tinea Capitis (Weitzman und Summerbell, 1995). Zu dieser Gattung zählen unter anderem die Spezies *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* und *T. tonsurans*.

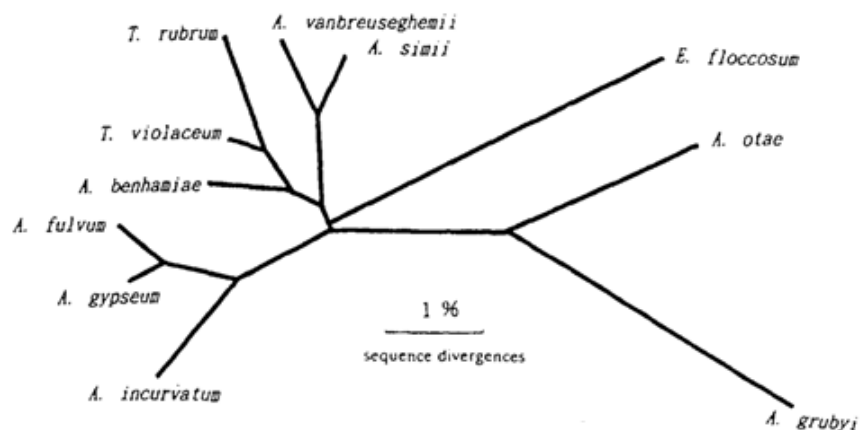


Abbildung 5: Die Phylogenie der Dermatophyten nach (Emmons, 1934, modifiziert)

Es existieren, neben Hautinfektionen durch *Candida* spp. oder durch die bereits genannten Dermatophyten, weitere humanpathogene Pilzspezies, die muköse Infektionen hervorrufen können. Trichosporonosis ist eine eher seltene jedoch schwerwiegende Mykose bei immunsupprimierten Patienten. Auslöser dieser Erkrankung sind hauptsächlich die Spezies *Geotrichum capitatum* sowie *Trichosporon* spp. (Girmenia et al., 2005). Invasive Infektionen mit *Geotrichum capitatum* beginnen mit der Aufnahme des Pilzes über die Atemwege oder den Verdauungstrakt. Infolge der Seltenheit einer Infektion mit dieser Spezies, ist die Behandlungsmethode unzureichend etabliert, sodass die Mortalitätsrate bei bis zu 75% liegt (Fouassier et al., 1998). *Trichosporon* spp., die ebenfalls zu Erkrankungen der Haut führen können, bilden sowohl Arthro- bzw. Blastokonidien als auch Hyphen und Pseudohyphen aus. Sie sind in der Lage Harnstoff, Urea, zu assimilieren (Chagas-Neto et al., 2008) und führen nach Infektion der Haut zu Problemen. Zu diesen Spezies gehören *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum* und *T. mucoides*. Neben Trichosporonosis existiert die Hautkrankheit Pityriasis versicolor, auch Kleienpilzflechte genannt. Sie wird von *Malassezia* spp. hervorgerufen, wie beispielsweise *Malassezia furfur*. *M. furfur* vereint zwei Hefen, früher bekannt unter *Pityrosporum orbiculare* und *P. ovale*, zu einer neubenannten Spezies, die dafür bekannt ist, Lipide zum Wachsen zu benötigen. Für die Umsetzung dieser Begebenheit verfügt *M. furfur* über verschiedene Enzymaktivität, beispielsweise Katalase und β -Carotin-Glucosidase, sowie über eine Temperaturtoleranz von 32-40 °C (Gaitanis et al., 2012).

3.3.3 *Pneumocystis jirovecii* – ein Schlauchpilz, ohne Möglichkeit der laboratorischen Kultivierung

Pneumocystis jirovecii – früher *Pneumocystis carinii* – verursacht die Krankheit *Pneumocystis*-Pneumonie, die unter Klinikern kurz als PCP bekannt ist. Erkennbar ist dieses Krankheitsbild beispielsweise anhand eines Röntgenbildes der Lunge. Die *Pneumocystis*-Pneumonie ist eine der am Häufigsten vorkommende opportunistische Krankheit immungeschwächter Patienten (Medrano *et al.*, 2005), wobei besonders AIDS-Patienten betroffen sind. PCP zeichnet sich bei dieser Patientengruppe durch eine hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate aus. Bis zu 40% der pädiatrischen und bis zu 80% der erwachsenen AIDS-Patienten haben diese Form der Pneumonie mindestens einmal übertragen (Ypma-Wong *et al.*, 1992). Neben einer Infektion mit *Aspergillus* spp. oder *Candida* spp. ist somit die Infektion der Lunge mit *P. jirovecii* klinisch sehr relevant. Eine Studie aus dem Jahr 2005 zeigt, dass selbst bei gesunden Erwachsenen DNA dieser Spezies in Proben des respiratorischen Trakts gefunden werden konnte (Medrano *et al.*, 2005). Die Identifizierung von *P. jirovecii* aus Patientenproben beruht lediglich auf dem Nachweis der DNA dieser Spezies oder auf mikroskopischen Analysen. Grund dafür ist die Tatsache, dass *P. jirovecii* im Labor nicht kultivierbar ist und demnach morphologische und physiologische Test auf Nährboden- oder Flüssigmediengrundlage kaum oder nur sehr aufwändig möglich sind.

3.4 Diagnostik in klinischen Laboratorien

In klinischen Laboratorien werden für die Identifizierung humanpathogener Pilze verschiedene konventionelle Methoden angewandt. Der Nachweis einer Candidiasis beispielsweise basiert sowohl auf mikroskopischen Methoden als auch auf der Kultivierung der Organismen. Die Kultivierung von *Candida* spp. kann jedoch sehr zeitaufwändig sein (Burgener-Kairuz *et al.*, 1994). Angewandte morphologische und physiologische Tests erfordern mehrere Tage bis sogar Wochen; zudem kommt es u.a. zu inakkuraten Identifizierungen (Hsiao *et al.*, 2005). Für eine adäquate und korrekte Identifizierung von Hefe- und Schimmelpilzen aus einer Patientenprobe ist auf der einen Seite eine sorgfältige und sinnvolle Probenentnahme von Nöten (Ruhnke, 2007). Andererseits spielen Erfahrungswerte eine entscheidende Rolle. Bei immunsupprimierten Patienten, die an einer sekundären Pilzinfektion erkrankt sind, spielt eine schnelle Identifizierung der fungalen Spezies eine entscheidende Rolle für das Überleben der Patienten. Eine Medikation mit adäquaten antifungalen Agenzien, die innerhalb von 12 Stunden nach Erhalt der positiven Blutkultur eingeleitet wurde, zeigt ein geringeres Sterberisiko der Patienten (vgl. Abbildung 6), als bei einem verzögerten Therapiebeginn (Morrell *et al.*, 2005).

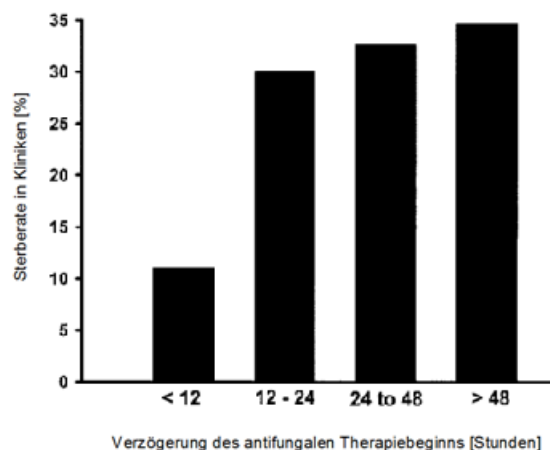


Abbildung 6: Prozentuale Sterberate in Kliniken in Abhängigkeit eines verzögerten Therapiebeginns. Die Sterberate von Patienten in Kliniken ist abhängig von dem initialen antifungalen Therapiebeginn. Die höchste Sterberate kann bei einem verzögerten Therapiebeginn von 24 bis 48 Stunden verzeichnet werden (Morrell *et al.*, 2005, modifiziert).

3.4.1 Kulturbasierte Diagnostik

Kulturelle Nachweismethoden stellen selbst heutzutage noch den Grundstein der Diagnostik, sozusagen den *Gold Standard*, dar (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007). Kommerzielle Systeme für die Identifizierung von Hefen, wie Ansetzen einer Blutkultur durch Animpfen einer Blutkulturflasche sind einfach zu handhabende Systeme und kostengünstiger als molekularbiologische Methoden. Mindestens 10 ml Blut pro Blutkulturflasche und je zwei Flaschen pro Patientenprobe gelten als Standard in der klinischen Diagnostik. Der positive Nachweis des Wachstums von Pilzspezies in Blutkultursystemen kann sich über Stunden bis

Tage hinziehen. Als Grundsatz gilt eine Bebrütungszeit von mindestens 7 Tagen, um selbst langsam wachsende *Candida* spp., wie *C. glabrata* oder *C. krusei* zu kultivieren (Ruhnke, 2007). Die Sensitivität dieser Methode zur frühen Erkennung einer Fungämie liegt lediglich bei bis zu 50 % (Farina *et al.*, 2012). An diese Kultivierung schließen sich weitere Tests wie Antimykotika-Resistenz-Bestimmungen an. Dies führt zu zusätzlichen Verzögerungen der Identifizierung. Fehldiagnosen infolge der Verwendung kommerzieller Kits beziehungsweise durch die Fehlinterpretation phänotypischer Tests sind bekannt (Leaw *et al.*, 2007). Auch eine Kontaminierung der Probe kann zu verfälschten Ergebnis und zu einer daraus resultierenden inadäquaten Medikation führen.

Diverse *Candida* spp. können durch den Einsatz von Chrom-Agar-Nährböden differenziert werden. Die Umsetzung chromogener Substrate des Mediums bewirkt die Bildung farbiger Kolonien. Je nach Hersteller variiert die farbige Ausprägung der Kolonien. *C. albicans* bildet grüne, *C. tropicalis* metallisch-blaue und *C. krusei* pinke Kolonien (Hersteller CHROMagar). Die Differenzierung zwischen weiteren *Candida* spp. gestaltet sich schwierig, da allesamt beigefarbene Kolonien aufweisen, sodass kein farblicher Unterschied erkennbar ist (vgl. Abbildung 7).

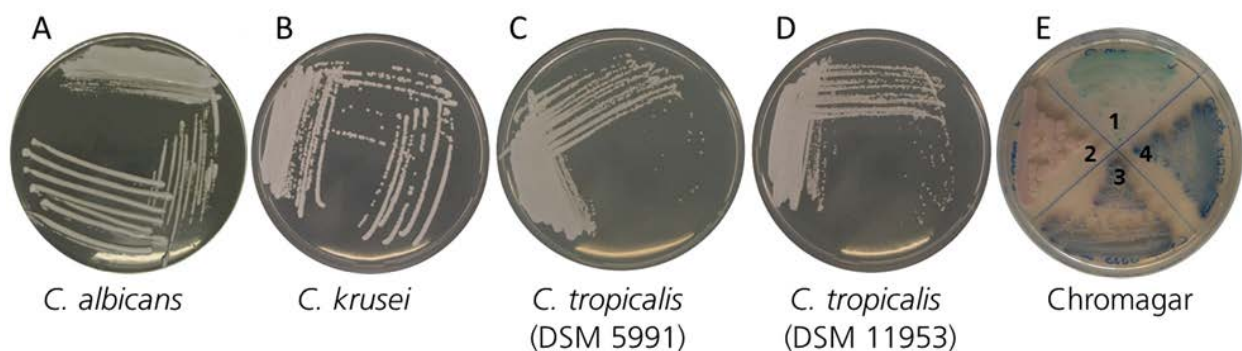


Abbildung 7: Kultivierung von *Candida* spp. auf unterschiedlichen Festmedien. A: *C. albicans*, B: *C. krusei*, C: *C. tropicalis* (DSM 5991), D: *C. tropicalis* (DSM 11953) auf YPD-Festmedium. E: Kultivierung der genannten Spezies auf Chromagar (Hersteller CHROMagar). 1: Grüne Kolonien von *C. albicans*, 2: pinke Kolonien von *C. krusei*, 3 + 4: blaue Kolonien von *C. tropicalis* (DSM 11953 und DSM 5993).

3.4.2 Nicht-kulturbasierte Nachweismethoden

Handelt es sich bei den zu untersuchenden Patientenproben um Abstrichpräparate von Schleimhäuten und Geweben oder um Flüssigkeitsproben wird ein mikroskopischer Nachweis erforderlich. Hierbei spielen Erfahrungswerte für die Beurteilung des Pathogens eine entscheidende Rolle. Durch den Einsatz von Licht-, Phasenkontrast- oder Fluoreszenzmikroskopen sind pilzliche Strukturen erkennbar (vgl. Abbildung 8). Das Anfärben mit Methyleneblau, Calcofluor-Weiss, Hämatoxylin-Eosin, Tusche oder Kalilauge erleichtert die Diagnostik (Ruhnke, 2007).

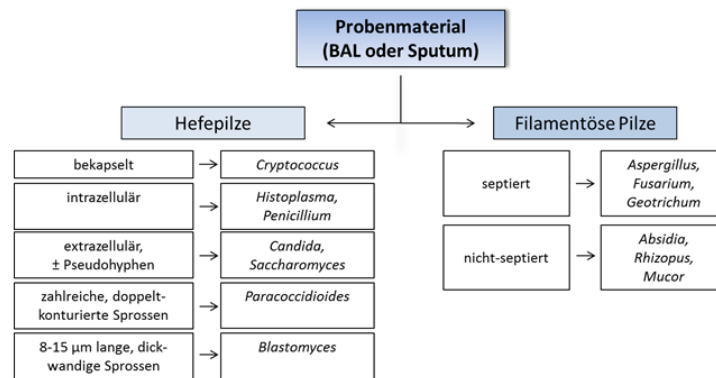


Abbildung 8: Mikroskopische Unterscheidungsmerkmale zwischen Hefe- und filamentösen Pilzen nach entsprechender Färbung mit z.B. Calcofluor-Weiss (Ruhnke, 2007, modifiziert).

Infektionen der Lunge, sogenannte Pneumonien, werden bspw. durch radiologische Diagnostikmethoden untersucht. Hierbei handelt es sich um computer- oder magnetresonanztomographische Aufnahme des Thoraxes. Es können dadurch Infektionen mit *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Cryptococcus* spp. oder *Pneumocystis jirevecii* nachgewiesen werden (Ruhnke, 2007). Humanpathogene Pilze können auch indirekt durch den Nachweis von Antikörpern oder Antigenen in Serum oder Liquor cerebrospinalis identifiziert werden. Kommerziell zu erhalten sind ELISA- und Hämagglutinationstest bzw. *Candida*-Mannan-Antigen- oder 1-3 Beta-D-glucan-Tests. Eine Kombination aus Antikörper- und Antigen-Nachweis steigert dabei die Sensitivität der Identifizierung (Ruhnke, 2007). Antigentests oder Biomarker-Monitoring werden in den Kliniken jedoch meist nur therapiebegleitend und nicht primär zur Diagnostik eingesetzt. In den letzten Jahren nahm die Speziesidentifizierung über Massenspektrometrie mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) in klinischen Laboratorien zu. Hierbei handelt es sich die Identifizierung mittels Proteinmassenanalyse. Rohe Zellextrakte können zur Speziesidentifizierung herangezogen und erhaltene Massenspektren mit Referenzdatenbanken verglichen werden. Dabei werden Proteine zwischen zwei und 20 kDa analysiert (Bader *et al.*, 2011). Zur Gewinnung roher Zellextrakte müssen zunächst Einzelkolonien von Hefepilzen bzw. Myzel oder Sporen von filamentösen Pilzen durch Kultivierungen gewonnen werden. Dies kann je nach Spezies mehrere Tage in Anspruch nehmen. Routinemäßig werden Einzelkolonien aus positiven Blutkulturflaschen gewonnen. Damit schließt sich die Subkultivierung zur Koloniegewinnung bereits an ein zeitintensives Verfahren an. Kultivierungen bringen oftmals die Gefahr einer Kontamination mit sich, welche zu Falschidentifizierungen führen können. Im Gegensatz zu öffentlich zugänglichen Datenbanken, wie der Nukleotid-Datenbank von NCBI, handelt es sich bei den MALDI-Massenspektren Referenzdatenbanken in der Regel um produktbezogene Datenbanken, die mit dem Kauf des ebenfalls kostspieligen Massenspektrometers verbunden sind.

3.4.3 Molekulare Labordiagnostik

3.4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für filamentöse Spezies wie *Aspergillus* spp. oder die nicht im Labor zu kultivierende Spezies *Pneumocystis jirevocii* dienen, neben mikroskopischen Methoden zur Identifikation, molekularbiologische Nachweissysteme. In den vergangenen Jahren wurden DNA-basierte Methoden zur Identifizierung pathogener Pilze entwickelt. Hierbei handelt es sich beispielsweise um PCR-Methoden, die sich durch ihre Einfachheit, Spezifität und Sensitivität auszeichnen (Hsiao *et al.*, 2005). Automatisierte Systeme zur Isolierung genomischer DNA aus humanpathogenen Pilzen, seien es einzellige Hefen oder Myzelstrukturen filamentöser Pilze, bestehen durch Schnelligkeit, Reinheit und einfache Handhabung. Die sich anschließende Vervielfältigung definierter Zielgene mittels PCR erlaubt eine relativ spezifische Identifizierung der Spezies. Es ist eine Vielzahl diverser PCR-Ansätze bekannt, die eine Detektion fungaler DNA aus sterilen Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben zulässt (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2007). Hierbei handelt es sich meist um „*in-house methods*“, d.h. eigens entwickelte PCR-Systeme jeweiliger Kliniken.

Eine quantitative Aussage über die fungale DNA-Konzentration innerhalb einer Probe erlaubt die Real-time PCR. Dabei handelt es sich um eine Fluoreszenz-gekoppelte exponentielle Vervielfältigung der DNA mittels PCR. Die Detektion der amplifizierten Produkte ist in ungefähr einer Stunde zu bewerkstelligen und demnach um einiges schneller als konventionelle PCR-Methoden (Espy *et al.*, 2006), jedoch wesentlich teurer, sowohl in der Anschaffung der notwendigen Geräte als auch in der Durchführung. Ein weiterer Nachteil ist, dass nur wenige Parameter parallel abgedeckt werden können. Möchte man eine höhere Speziesbandbreite abdecken, so sind additive Tests von Nöten. Dies ist wiederum mit zusätzlichem Zeit- und Kostenaufwand verbunden.

3.4.3.2 Sequenzierung

Eine adäquate Methode zur Identifizierung humanpathogener Pilze nach Isolierung und Amplifikation genomischer DNA stellt die Sequenzierung dar. Für die taxonomische und phylogenetische Einordnung der sequenzierten Daten müssen Alignierungen vorgenommen werden. Das bedeutet, die erhaltenen DNA-Sequenzen müssen beispielsweise mit veröffentlichten Daten verglichen werden. Hierfür benötigen klinische Laboratorien Personal mit phylogenetischer Expertise, um die Sequenzierungsergebnisse deuten zu können. Die phylogenetische Aussage beruht auf Identitätswerten, die Aufschluss über die alignierten Basen geben, d.h. über identische Nukleotide in Relation zu der Länge der Alignierung. Je nach Qualität und Länge der Sequenz können diese Identitätswerte variieren. Für *Fusarium* spp. und *Aspergillus* spp. konnte dieses System bereits erfolgreich bei der Speziesidentifizierung getestet werden (Balajee *et al.*, 2009). Neben einer sequenzgenauen Identifizierung bringt diese Methode jedoch hohe Kosten mit sich. Zudem müssen Vergleichsdaten der zu identifizierenden Spezies vorliegen, sei es in öffentlich zugänglichen oder in eigens aufgebauten Datenbanken.

3.5 Identifikation humanpathogener Pilze mittels Mikroarray-Analyse

3.5.1 Hintergrundinformationen zu DNA-Mikroarrays

Die Entwicklung von Mikroarray-Technologien begann in den 1990er Jahren. Dies brachte den großen Vorteil einer simultanen Abdeckung vieler Parameter einer einzelnen Probe mit sich (Loy und Bodrossy, 2006). DNA-Mikroarrays wurden ursprünglich für die Analyse der gesamtgenomischen Genexpression entwickelt (Skena *et al.*, 1995). In den vergangenen Jahren kamen Publikationen aus weiteren Feldern wie umweltmikrobiologischer Analysen (Guschin *et al.*, 1997), Untersuchungen von Mykotoxinen in Lebensmitteln (Schmidt-Heydt und Geisen, 2007), Identifizierungen von Viren (Wang *et al.*, 2002, Chiu *et al.*, 2008), Bakterien (Anthony *et al.*, 2000, Chizhikov *et al.*, 2001, Giammarinaro *et al.*, 2005, Cleven *et al.*, 2006) und Pilzen (Hsiao *et al.*, 2005, Leinberger *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2006) hinzu. Der Fokus einer Vielzahl der etablierten DNA-Mikroarrays liegt dabei auf der Identifizierung humanpathogener Mikroorganismen für klinische Anwendungen. Zudem erschienen Veröffentlichungen zur methodischen Entwicklung von DNA-Mikroarrays (Heller, 2002, Lane *et al.*, 2004, Letowski *et al.*, 2004, Ratushna *et al.*, 2005).

Während der vergangenen Jahre setzten sich planare Glas-Mikroarrays durch. Sie bestechen durch vielfältige Verwendungszwecke und moderate Kosten. DNA-Mikroarrays zeichnen sich durch kurze Oligonukleotide, sogenannte Sonden, aus. Diese sind in den meisten Fällen kovalent über das 5'-Ende mit aktiven Gruppen der beschichteten Oberfläche des Glaträgers immobilisiert (Loy und Bodrossy, 2006). Dieser Immobilisierungsvorgang wird auch Spotten genannt. Gespottet werden Sonden sowohl in sense-, als auch in antisense-Orientierung. Sie bilden das Gegenstück zu einem kurzen Abschnitt des durch PCR amplifizierten Zielgens. Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer oder Nukleotide während der PCR, werden markierte Amplikons generiert. Diese hybridisieren bei einer definierten Temperatur an die gespotteten Sonden (vgl. Abbildung 9). Der Nachweis der Hybridisierung erfolgt durch Auslesen von Fluoreszenzsignalen nach Entfernen ungebundener PCR-Amplifikate. Vorteil von DNA-Mikroarray-Analysen ist die parallele Hochdurchsatz-Identifizierung vieler DNA-Moleküle (Bodrossy und Sessitsch, 2004). Dies erlaubt einen enormen Zeit- und Kostenvorteil im Vergleich zu konventionellen Identifikationsmethoden.

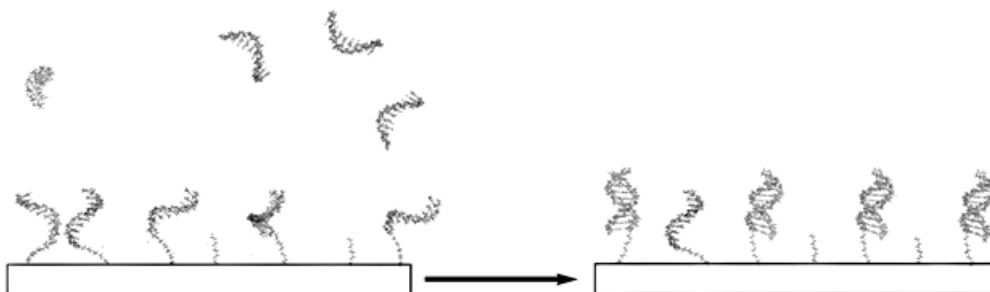


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer planaren Mikroarray-Oberfläche mit immobilisierten Sonden und dem Hybridisierungsereignis. Links: Zugabe doppelsträngiger Oligonukleotide zu immobilisierten Oligonukleotidsonden. Rechts: Hybridisierung der zugegebenen Oligonukleotide an die spezifischen Sonden durch intramolekulare Watson-Crick Basenpaarungen (Southern, 1999, modifiziert).

3.5.2 Stand der Technik der DNA-Mikroarrays in der klinischen Diagnostik

Neben Mikroarray-Studien, die sich auf Aspekte wie Pathogenität, transkriptionelle Genregulation oder die globale Genexpression filamentöser Pilze oder Hefen beziehen, nimmt das Interesse an Mikroarrays als klinisches Diagnostik-Verfahren stetig zu. Im Vergleich zu den bereits beschriebenen Diagnostikverfahren (vgl. 3.4) bringt die Verwendung von DNA-Mikroarrays für die Identifizierung humanpathogener Pilze einige Vorteile mit sich. Die planare Oberfläche eines DNA-Mikroarrays erlaubt das Spotten einer Vielzahl unterschiedlicher Sonden. Es handelt sich dabei um kurze Oligonukleotidsequenzen, die für jeden Pilz spezifisch sind und eine eindeutige Identifizierung der einzelnen Spezies erlauben. Nach Isolierung der DNA einer Patientenprobe werden Zielsequenzen mittels PCR amplifiziert. Fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte werden anschließend mit dem DNA-Mikroarray hybridisiert. Die Hybridisierungsereignisse können anschließend durch Fluoreszenzsignale ermittelt und der/den jeweiligen Spezies zugeordnet werden. Eine Patientenprobe kann dadurch auf das Vorkommen von DNA verschiedener Spezies simultan untersucht werden. Aufgrund unterschiedlicher Antimykotika-Resistenzen bzw. Sensitivitäten vieler selbst nahverwandter Spezies, ist eine akkurate Identifizierung auf Speziesebene entscheidend. Sie erlaubt dem Kliniker eine adäquate Medikation des betroffenen Patienten. Bei einer frühen adäquaten antifungalen Therapie kann die Sterberate der Patienten reduziert (Fernandez *et al.*, 2009) und das Risiko von Nebenwirkungen verringert werden.

3.5.2.1 Zielsequenzen für die Identifizierung humanpathogener Pilze mittels DNA-Mikroarray

Für eine Identifizierung humanpathogener Pilze auf Speziesebene sind eindeutige Zielsequenzen innerhalb des Pilzgenoms entscheidend. Diese sollten evolutionär variable sowie konservierte Regionen aufweisen. Konservierte Sequenzen, die variable Bereiche der Zielregion flankieren, bringen den Vorteil der Verwendung Pilz-universeller Primerpaare für die Amplifikation der Zielstruktur mit sich. Für die Identifizierung vieler verschiedener Spezies ist sonst eine *Multiplex-PCR* von Nöten. Die Anzahl der benötigten Primer kann durch die Verwendung universeller Primer gering gehalten werden, was sich positiv auf die Amplifikation der Zielstrukturen auswirkt. Innerhalb der variablen Regionen müssen speziesspezifische Sonden identifiziert werden, die sich über mindestens ein Nukleotid bzw. Basenpaar von anderen Spezies unterscheiden. Je mehr Nukleotide sich innerhalb der Sondensequenz einer Spezies zur äquivalenten Sequenz in anderen Spezies unterscheiden, desto höher ist die Diskriminierungskraft der Sonde. Neben der Spezifität ist auch die Sensitivität der Detektion wichtig: Umso höher die Anzahl der Genkopien der Zielsequenzen ist, desto höher ist auch die Sensitivität. Erhöhte Sensitivität kann z.B. durch *multi-copy genes* erreicht werden (Ferrer *et al.*, 2001).

Für das Sondendesign spielt die Sequenzverfügbarkeit der Zielsequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken ebenfalls eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit wurde auf Sequenzen des *National Center for Biotechnology Information* zurückgegriffen. Je mehr Einträge sequenzierter Zielregionen veröffentlicht sind, desto aussagekräftiger gestaltet sich das *in silico*-Design von Sonden und Primern. Eine für die Spezies-Identifizierung in der medizinischen Mikrobiologie anerkannte Methode ist die Verwendung des ribo-

somalen Clusters. Dieses umfasst für die Mykologie die *internal transcribed spacer 1* und *2*, sowie die *5.8S* rRNA (Korabecna, 2007) und wird oftmals abkürzend als ITS-Region bezeichnet. Flankiert wird die ITS-Region von Sequenzen, die für die große und kleine ribosomale codieren. Für *Candida* spp. ist bekannt, dass 50-100 rDNA-Kopien im Genom vorkommen können (Ahmad *et al.*, 2002), sodass wie bereits erwähnt, durch die Anwesenheit mehrerer Zielsequenz-Kopien, die Sensitivität der Detektion erhöht werden kann.

Die ITS-Region evolvierte am schnellsten und zeigt eine hohe Varianz zwischen Spezies eines Genus (White *et al.*, 1990). *C. albicans* beispielsweise verfügt über ITS-Regionen mit einer Länge von 434 bp, während ITS-Regionen von *C. glabrata* mit 705 bp deutlich länger sind (Lott *et al.*, 1993). Diese Sequenzunterschiede können z.B. durch Insertionen oder Deletionen entstanden sein. Sie bieten die Möglichkeit die Spezies über kurze Oligonukleotid-Sonden voneinander zu unterscheiden. Bereits 1990 veröffentlichte White *et al.* Primersequenzen zur Amplifikation der fungalen ITS-Region (White *et al.*, 1990). Die Primer liegen in konservierten Genabschnitten des Clusters und sind zur universellen Amplifikation von Pilzen geeignet. Das Primerpaar ITS 1 und ITS 4 amplifiziert die gesamte ITS-Region. Innerhalb der konservierten 5.8S liegen die Primer ITS 2 und ITS 3. Ihre Sequenzen entsprechend dem reversen Komplement voneinander (vgl. Abbildung 10).

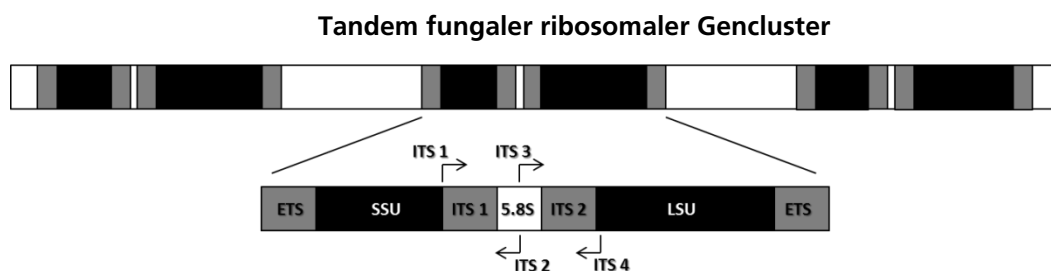


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Tandems fungaler ribosomaler Gencluster. ETS (5' und 3' external transcribed spacer), Gen für die kleine ribosomale Untereinheit (small ribosomal subunit = SSU) und die große ribosomale Untereinheit (large ribosomal subunit = LSU), *internal transcribed spacer 1* und *2* (ITS1 und ITS2) sowie das Gen für die *5.8S*. Dargestellt sind ebenfalls die Primer ITS 1, ITS 2, ITS 3 und ITS 4 (White *et al.*, 1990) mittels Pfeilen. Die Primer ITS 1 und ITS 4 amplifizieren die gesamte ITS-Region. Primer ITS 2 und ITS 3 sind das reverse Komplement zueinander und können zur Amplifizierung von nur einer Hälfte der ITS-Region eingesetzt werden.

Sequenzen der großen (LSU) und kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU) werden neben der ITS-Region ebenfalls für die Identifizierung humanpathogener Pilze herangezogen. Weitere funktionelle Gene für die Identifizierung auf Speziesebene sind β -Tubulin und Calmodulin und der pilzspezifische Elongationsfaktor 3. Die Sequenzverfügbarkeit dieser funktionellen Zielgene in der NCBI-Datenbank ist jedoch nicht so umfangreich wie es bei der ITS-Region der Fall ist.

Neben der hohen Sequenzverfügbarkeit und der Verwendung universeller panfungaler Primer beruht das Primer- und Sondendesign für die speziesgenaue Identifizierung von 56 humanpathogenen Pilzen in dieser Arbeit auf der Grundlage der ITS-Sequenzen innerhalb der NCBI-Datenbank. Bisher veröffentlichte Mikroarrays zur Identifizierung humanpathogener Pilzspezies beruhen meist auf Genen bzw. Sequenzen des ribosomalen Clusters. Jedoch weisen diese generell einen geringeren Umfang an identifizierbarer Pilzspezies auf (Wu *et al.*, 2003, Coignard *et al.*, 2004, Leinberger *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2006, Zeng *et al.*, 2007, Campa *et al.*, 2008). Das in dieser Arbeit etablierte *PCR-Array-System* grenzt sich neben der hohen Anzahl zu diskriminierender Spezies zudem durch eine hohe Sensitivität, die den Nachweis sehr geringer DNA-Molekülnzahlen erlaubt, von bereits veröffentlichten Mikroarrays ab.

3.5.3 Einsatz von Lab-on-a-chip Systemen in der klinischen Diagnostik

In den vergangenen Jahren nahm das Interesse an der Miniaturisierung analytischer Techniken stark zu (Srinivasan *et al.*, 2003, Ahn *et al.*, 2004, Sia und Kricka, 2008, Tomazelli Coltro *et al.*, 2014). Sogenannte Lab-on-a-chip (LOC)-Systeme schaffen die Möglichkeit laboratorische Arbeitsvorgänge zu minimalisieren und in einer Kartusche bzw. in einem Gerät zu vereinen. Durch den Einsatz von LOC-Systemen können kostspielige Reagenzien in ihrem Volumen reduziert, Kosten, Zeit und Personal eingespart werden. Für die Umsetzung einzelner Abläufe im Labor sind unterschiedliche Gerätschaften, Chemikalien, Kits und Reaktionsgefäße notwendig. Jedes klinische Labor verfügt über andere Geräte und betriebseigene Methoden. Durch die Integration einzelner Schritte in ein LOC-System ist eine Standardisierung der einzelnen Abläufe möglich.

Für die Identifizierung fungaler Spezies aus klinischen Proben ist zunächst die Isolierung und Aufreinigung der DNA notwendig. Anschließend erfolgen die Amplifizierung von Zielgenen und die Identifizierung der Spezies mittels DNA-Mikroarray. Durch den Einsatz dieser sensitiven Identifikationsmethode kann neben den Volumina einzusetzender Reagenzien zudem das Volumen der Patientenprobe verringert werden. Die Patientenprobe kann direkt nach Entnahme, im Idealfall direkt am Patientenbett, prozessiert werden. Innerhalb des LOC-Systems können alle Arbeitsabläufe hintereinandergeschaltet ablaufen, wodurch es zu einer enormen Zeitersparnis und einer frühen Identifikation der Pathogene kommt. Durch den integrierten Einsatz von Mikroarrays in LOCs ist eine akkurate, verlässliche Identifizierung gegeben. Eine schnelle und adäquate Medikation kann eingeleitet und damit die Lebenserwartung der Patienten erhöht werden. Bereits im Jahre 2006 erklärten Daw und Finkelstein, dass LOCs die Möglichkeit zur „*Point-of-care*“-Diagnostik bieten, die die Medizin revolutionieren kann (Daw und Finkelstein, 2006). Bereits auf dem Markt sind LOC-Systeme der Curetis AG wie beispielsweise das Unyvero™-System für die Identifizierung von Pathogenen verantwortlich für Pneumonien oder Implantat- und Gewebeinfektionen.

3.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Invasive Pilzinfektionen erfordern aufgrund hoher Mortalitätsraten eine schnelle und adäquate Medikation der meist immunsupprimierten Patienten. Die akkurate und zeitnahe Identifizierung der verantwortlichen humanpathogenen Pilzspezies ist dafür von zentraler Bedeutung. Konventionelle Diagnostikmethoden in klinischen Laboratorien beruhen oftmals auf zeitintensiven Kultivierungen der Patientenproben, die je nach Spezies Tage bis Wochen in Anspruch nehmen. Zudem bergen sie das Risiko von Kontaminationen und falsch identifizierten Spezies. Empirische Therapien, die während der Kultivierungsdauer der Patientenproben oftmals eingeleitet werden, können aufgrund inadäquater Antimykotika unwirksam sein und den Zustand des Patienten verschlechtern.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines sensitiven *PCR-Array-Systems* zur Identifizierung von 56 humanpathogenen Pilzspezies für klinische Anwendungen. Der Nachweis soll innerhalb weniger Stunden erbracht werden und beruht auf DNA-Zielsequenzen, die eine hohe Sequenzvariabilität unter den einzelnen Spezies aufweisen. Die Anzahl der Pathogenzellen in den Patientenproben variiert je nach Probenmaterial, Zeitpunkt der Probennahme und Anamnese des Patienten. Um eine Identifizierung von selbst geringen Zell- und DNA-Molekülzahlen zu erreichen ist die Entwicklung einer sensitiven PCR-Methode ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit. Das *PCR-Array-System* soll mit DNA von Referenzspezies und mit DNA von Patientenproben evaluiert werden. Die Befunde der Patientenproben, die auf zeitintensiven mikrobiologischen Methoden beruhen, sollen mit den Ergebnissen des *PCR-Array-Systems* verglichen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agar-Agar Granuliert BD	TH Geyer, Renningen, D
Agarose	Axygen Biosciences, Union City, Californien, USA
<i>Aqua moleculare</i>	ACILA Dr. Weidner GmbH, Weiterstadt, D
dNTPs (100 mM)	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
GeneRuler™ 6x Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
GeneRuler™ 1kb plus DNA Ladder, ready-to-use	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
GoTaq® Flexi DNA Polymerase M830	Promega Corporation, Madison, USA
Green GoTaqFlexi Puffer M891 ohne MgCl ₂ (5x)	Promega Corporation, Madison, USA
Hybridisierungspuffer A	EUROIMMUN AG, Lübeck, D
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Malzextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
MgCl ₂ A351	Promega Corporation, Madison, USA
Midori Green Advanced	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ochsengalle	Merck KGaA, Darmstadt, D
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Soja-Pepton	Sigma Aldrich, Steinheim, D
TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, D
TWEEN 40	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Waschreagenzien 1, 2, 3	EUROIMMUN AG, Lübeck, D

4.1.2 Nährmedien

Tabelle 2: Nährmedien

Medium	Hersteller/Zusammensetzung
Kartoffel-Glucose-Agar (PDA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Kartoffel-Glucose-Bouillon	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
LB-Medium	12,0 g Bactopecton 6,0 g Hefeextrakt 6,0 g NaCl Ad 600 ml ddH ₂ O
LB-Ampicillin-Medium	12,0 g Bactopecton 6,0 g Hefeextrakt 6,0 g Natriumchlorid 600 ml ddH ₂ O 100 µg/ml Ampicillin
Malzextrakt-Pepton-Medium (MEP)	30,0 g Malzextrakt 3,0 g Sojapepton Ad 1,0 l ddH ₂ O pH 5,6

Medium	Hersteller/Zusammensetzung
Pityrosporium-Medium (PITYRO)	40,0 g Malzextrakt 20,0 g Ochsen-galle 10,0 g Tween40 Ad 1,0 l ddH ₂ O Nach dem Autoklavieren zugeben: 2,0 ml Glycerin (87%) 2,0 ml Olivenöl
Yeast-Peptide-Extract (2x)- Medium (YPE)	40,0 g Bacto-pepton 20,0 g Bacto Yeast Extract Ad 1,0 l ddH ₂ O
Yeast-Peptide-Dextrose (1x)- Medium (YPD)	300 ml YPE (2x) 30 ml Glucose-lösung (40%) 300 ml ddH ₂ O

4.1.3 Puffer und Lösungen

Für die benötigten Puffer und Lösungen wurde der pH-Wert bei Bedarf mit 2 M NaOH-bzw. 1 M HCl-Lösung eingestellt und anschließend 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert bzw. hitzeempfindliche Lösungen und Puffer steril filtriert (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Medium	Hersteller/Zusammensetzung
EDTA 0,5 M, pH 8,0	146,12 g EDTA Ad 1,0 l ddH ₂ O
Glucose-Lösung (40%)	178 g Glucose-Monohydrat Ad 400 ml ddH ₂ O
TAE-Puffer (50x)	242,0 g TRIS 57,1 ml Eisessig 100,0 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0 Ad 1,0 l ddH ₂ O
TRIS-HCl (1M)	121,13 g TRIS Ad 1,0 l ddH ₂ O
TE-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM EDTA
Yeast-Lysis-Buffer	2% (w/v) Triton X-100 1% (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

4.1.4 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Glasperlen Ø 0,25-0,5 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Kryoröhrchen (2ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Einmal-Impfösen (1 µl und 10 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Einmal-Küvetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Filterspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Parafilm®M	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
PCR-Reaktionsgefäße	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, D
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, D
Pipettenspitzen	Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach, D
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Probenröhrchen 2,0 ml, farblos, steril	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
Filterpapiere Ø 270 mm	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D

4.1.5 Enzyme und Kits

Tabelle 5: Enzyme und Kits

Name	Hersteller
Plasmid Maxi Kit QIAGEN	Qiagen GmbH, Qiagenstr. 1, 40724 Hilden
RNase A [10mg/ml]	Sigma Aldrich, Steinheim, D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Qiagenstr. 1, 40724 Hilden

4.1.6 Pilzspezies und Kultivierungsbedingungen

Tabelle 6: Pilzspezies und Kultivierungsbedingungen. Bevorzugt wurden Typstrains. Neben der Quelle der Spezies wurden das jeweilige Kultivierungsmedium wie Kartoffel-Glucose-Medium (PDA), Malzextrakt-Pepton-Medium (MEP), Yeast-Pepton-Dextrose-Medium (YPD) und Pityrosporum-Medium (PITYRO) und die Kultivierungstemperatur (Tmp) genannt. Spezies, die der Sicherheitsstufe L3 unterliegen, wurden nicht kultiviert (L3). Von den Spezies *Pneumocystis jiroveci* und *Sporothrix schenckii* lag lediglich DNA vor, sie wurden nicht kultiviert. Zudem sind die Quellen der Spezies angegeben: (American Type Culture Collection) ATCC, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) und ob ein Typestrain (X) vorlag.

Name	Stamm	Typestrain	Quelle	Medium	Tmp (°C)
<i>Absidia caerulea</i>	DSM 3018	X	DSMZ	PDA	25
<i>Absidia spinosa</i>	DSM 3192		DSMZ	PDA	25-30
<i>Absidia cylindrospora</i>	ATCC 22751		ATCC	PDA	25
<i>Absidia glauca</i>	DSM 811		DSMZ	PDA	25
<i>Absidia corymbifera</i>	DSM 1144		DSMZ	PDA	30
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	CBS 137.72	X	CBS		L3
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	CBS 114389		CBS		L3
<i>Arthroderma otae</i>	DSM 10708		DSMZ	MEP	30
<i>Arthroderma gypseum</i>	DSM 3824		DSMZ	MEP	25
<i>Aspergillus flavus</i>	DSM 1959		DSMZ	PDA	25
<i>Aspergillus fumigatus</i>	FY11		IGB	PDA	30
<i>Aspergillus niger</i>	FY12		IGB	PDA	30
<i>Aspergillus terreus</i>	DSM 826		DSMZ	PDA	37
<i>Candida albicans</i>	SC 5314 (Can14)		IGB	YPD	30
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987		CBS	YPD	30
<i>Candida famata</i>	DSM 70244		DSMZ	YPD	30
<i>Candida glabrata</i>	DSM 70614		DSMZ	YPD	30
<i>Candida guilliermondii</i>	DSM 11947		DSMZ	YPD	30
<i>Candida kefyr</i>	DSM 5572	X	DSMZ	YPD	30
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258		ATCC	YPD	30
<i>Candida lusitanae</i>	DSM 70102		DSMZ	YPD	30
<i>Candida metapsilosis</i>	CBS 10907	X	CBS	YPD	30
<i>Candida orthopsilosis</i>	CBS 10906	X	CBS	YPD	30
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019		ATCC	YPD	30
<i>Candida pulcherrima</i>	DSM 70336	X	DSMZ	YPD	30
<i>Candida tropicalis</i>	DSM 11953	X	DSMZ	YPD	30
<i>Coccidioides immitis/</i> <i>Coccidioides posadasii</i>	CBS 711.73		CBS		L3
<i>Cryptococcus gattii</i>	CBS 10865	X	CBS	PDA	25
<i>Cryptococcus neoformans</i> var.	ATCC 208821	X	ATCC	PDA	30
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CBS 10080		CBS	PDA	25
<i>Dipodascus capitatus</i>	CBS 197.35		CBS	YPD	25
<i>Epidermophyton floccosum</i>	DSM 10709		DSMZ	MEP	30
<i>Fusarium solani</i>	DSM 10696		DSMZ	PDA	25
<i>Malassezia furfur</i>	DSM 6170		DSMZ	PITYRO	30
<i>Mucor hiemalis</i>	DSM 2656	X	DSMZ	MEP	25
<i>Mucor plumbeus</i>	DSM 16513	X	DSMZ	MEP	25
<i>Mucor pusillus</i>	DSM 1331		DSMZ	MEP	25
<i>Mucor racemosus</i>	DSM 5266	X	DSMZ	MEP/PDA	30-37

Name	Stamm	Typestrain	Quelle	Medium	Tmp (°C)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	CBS 118890		CBS	L3	
<i>Penicillium marneffei</i>	ATCC 18224		ATCC	MEP/PDA	25-30
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	DNA		IGB	Nicht kultiviert	
<i>Pseudallescheria boydii</i>	CBS 128085		CBS	PDA	25-30
<i>Rhizopus microsporus</i>	ATCC 46351		ATCC	PDA	25
<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM 854		DSMZ	PDA	30
<i>Rhizopus stolonifer</i>	DSM 855		DSMZ	PDA	25
<i>Rhodotorula minuta</i>	DSM 3016		DSMZ	YPD	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L6294		IGB	YPD	30
<i>Sporothrix schenckii</i>	CBS 117440		CBS	Nicht kultiviert	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	DSM 4870		DSMZ	MEP	30
<i>Trichophyton rubrum</i>	DSM 16111		DSMZ	MEP	25
<i>Trichophyton tonsurans</i>	DSM 12285		DSMZ	MEP	25
<i>Trichosporon asahii</i>	CBS 2479	X	CBS	MEP	30
<i>Trichosporon asteroides</i>	CBS 2481	X	CBS	YPD	25
<i>Trichosporon cutaneum</i>	DSM 27285		DSMZ	YPD	25
<i>Trichosporon mucoides</i>	CBS 7625	X	CBS	YPD	25

4.1.7 Bakterien und Kultivierungsbedingungen

Tabelle 7: Bakterien und Kultivierungsbedingungen

Name	Stamm	Kultivierung
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	LB-Medium, 37°C

4.1.8 Technisches Equipment

Tabelle 8: Technisches Equipment

Name	Typbezeichnung	Hersteller/Lieferant
Array-Scanner	EUROIMMUN Microarray YG 0601-0101	EUROIMMUN AG, Lübeck, D
Array-Hybridisierungsschablone	Titerplane EUROIMMUN YG 0615-0101	EUROIMMUN AG, Lübeck, D
Array-Hybridisierungskammer	YG 0615-0101-1	EUROIMMUN AG, Lübeck, D
Gelelektrophorese-Apparatur		PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Geldokumentation	Camilla High Resolution Digital Camera	Raytest GmbH, Straubenhardt, D
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Homogenisator	Minilys 91-PCSM	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Horizontalschüttler		M. Zipperer GmbH, Staufen
Pipetten	Einkanalpipetten	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Thermo Cycler	2720 Thermal Cycler	AB applied biosystems, Carlsbad, California, USA
	Research Peltier ThermoCycler PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
Vortexer	VortexGenie	Eppendorf AG, Hamburg, D
Inkubationsschüttler	Innova44	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Mikroskop	AxioCam MRm	Carl Zeiss SMT GmbH, Oberkochen, D
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Brutschrank	BM 200	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Gefrierschränke	-20°C GS203	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
	-80°C Herafreeze HFU 686	Liebherr GmbH, Biberach, D
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, D

Name	Typbezeichnung	Hersteller/Lieferant
Zentrifugen	Biofuge Pico17 Biofuge Frisco 17 Multifuge 3 SR Megafuge 1.0	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Reinluftwerkbank	HeraSafe Typ KS18	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
	MSC-Advantage	Thermo Scientific, München, D
Waagen	Feinwaage A120S	Sartorius AG, Göttingen, D
	Grobwaage L2200S+	

4.1.9 Software

Tabelle 9: Software

Name	Anbieter
ARB Software	Technische Universität München, D (Ludwig <i>et al.</i> , 2004), http://www.arb-home.de/
ApE – A plasmid Editor v1.12	Edited by M. Wayne Davis http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/
SILVA – The rDNA Database Project Pruesse 2007	Max Planck Institut für Marine Mikrobiologie, Microbial Genomics Group, Bremen http://www.arb-silva.de/
EURO Array Scan Version 1.0.9.252	EUROIMMUN AG, Lübeck, D
NCBI	NCBI, Bethesda, USA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Oligo Analyzer 3.1	Integrated DNA Technologies, BVA, Leuven, Belgien, http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/
Umrechnung: Gewicht – Mol (für Nukleinsäuren)	Molbiol Russland, http://www.molbiol.ru/ger/scripts/01_07.html

4.1.10 Primer

Tabelle 10: Primer des finalen Protokolls. Primer, die während der Arbeit entwickelt und getestet wurden, aber nicht Inhalt des finalen Protokolls sind, befinden sich im Anhang (vgl. Tabelle 51).

Name	Orientierung	Sequenz 5'-3'	Quelle
ITS 1	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
ITS 2	Reverse	GCTGCGTTCATCGATGC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS 3	Forward	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS 4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990

4.2 Methoden

4.2.1 Anzucht von Hefen und filamentösen Pilzen

Die Kultivierungsbedingungen der Referenzstämme, die der Sicherheitsstufe 1 und 2 unterliegen, sind Tabelle 6 zu entnehmen. Spezies mit Sicherheitsstufe 3 wurden nicht kultiviert, hier lag lediglich DNA vor. Die Dauer der Kultivierung hing sowohl von der Zielsetzung des sich anschließenden Versuchs sowie von der Wachstumsrate der unterschiedlichen Spezies ab.

4.2.2 Kryokonservierung von Hefen

Zur langfristigen Lagerung von Hefen wurden diese unter den in Tabelle 5 zu entnehmenden Bedingungen kultiviert, bis sich eine deutlich sichtbare Trübung des Mediums eingestellt hatte. Die Hefesuspension wurde 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in 500 µl YPD resuspendiert und in Kryoröhrchen übertragen, die bereits 500 µl Glycerin (87 %) enthielten.

4.2.3 Kryokonservierung filamentöser Pilze

Filamentöse Pilze wurden zur Lagerung auf Nährböden kultiviert, bis sich ein flächendeckendes Myzel gebildet hatte (vgl. Tabelle 6). Bei starken Sporenbildnern wie *Aspergillus fumigatus* wurden Kryoröhrchen mit je 500 µl Glycerin (87 %) und Medium vorbereitet und Sporen des Pilzes mit einer sterilen Impföse in das Kryoröhrchen übertragen. Nach einer mind. zweistündigen Inkubation bei -80° C konnten die hydrophoben Sporen in der gefrorenen Glycerin-Medium-Suspension homogenisiert werden. Filamentöse Pilze wie *Rhizopus oryzae* bilden ein sehr verflochtenes Myzel ohne Sporen, sodass hier eine Konservierung nur über Myzelfragmente in Glycerin-Medium stattfinden konnte. Selbst bei einer Kultivierung in Flüssigmedium entstand bei diesen Spezies ein einzelnes zusammenhängendes Myzel.

4.2.4 Isolierung genomischer DNA aus Hefen und filamentösen Pilzen

4.2.4.1 Erste Schritte der DNA-Isolierung bei Hefen

Aus einer flüssigen Übernacht-Kultur wurden 10 ml Hefesuspension bei 4.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen wurden die Zellpellets in 0,5 ml sterilem ddH₂O durch vortexen resuspendiert, 5 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gewaschenen Zellen wurden in 400 µl Yeast Lysis Buffer resuspendiert und in Probenröhrchen, die mit Glaskügelchen auf ein Volumen von 400 µl gefüllt waren, pipettiert. Unter dem Abzug wurden 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben.

4.2.4.2 Erste Schritte der DNA-Isolierung bei filamentösen Pilzen

Nach Anzucht der filamentösen Pilze in Flüssigmedium wurde der Inhalt des Erlenmeyerkolbens in einen Trichter mit Filtermembran übertragen. Das flüssige Medium floss daraufhin ab, sodass das Myzel aus dem Filter entnommen werden konnte. Restflüssigkeit wurde durch Druck auf das Myzel durch Zellstoff entfernt, mit sterilem ddH₂O gewaschen und wieder durch Zellstoff getrocknet. Das Myzel wurde anschließend abgewogen und in mind. 100 mg Portionen aufgeteilt. Unter dem Abzug wurden 400 µl Yeast Lysis-Buffer und 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) in die Probenröhrchen pipettiert.

4.2.4.3 Ablauf der DNA-Isolierung und DNA-Aufreinigung

Nachdem die Zellsuspensionen zusammen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Glaskügelchen in Probenröhrchen vorlagen, wurden diese 120 Sekunden bei 5.000 rpm homogenisiert, sofort in die auf 4° C vorgekühlte Kühlzentrifuge überführt und 10 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die wässrige DNA-Phase wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 ml 100 % EtOH (-20° C) zugegeben, gründlich homogenisiert und mind. 30 Minuten zur Fällung der Nukleinsäuren bei -20° C inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend 10 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die enthaltenen Pellets in 400 µl 1x TE-Puffer durch vortexen resuspendiert. Nach einer Zugabe von 3 µl RNaseA-Lösung wurde diese durch Pipettieren gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml 100 % EtOH (-20° C) zugegeben, gevortext und zur Fällung mindestens 30 Minuten bei -20° C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet in 50 µl H₂O aqua molekulare resuspendiert und für 10 Minuten bei 65° C inkubiert. Für eine längerfristige Lagerung wurden die Reaktionsgefäße bei -20° C aufbewahrt.

4.2.5 Bestimmung von Konzentration und Reinheit isolierter DNA

Konzentration sowie Reinheit der mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isolierten DNA wurde am Spektral-photometer bestimmt. Die Absorption der in *Aqua moleculare* gelösten DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Für die Amplifizierung der Zielgene wurden alle isolierten wässrigen DNA-Lösungen der Referenzspezies auf die gewünschte Konzentration in ng/µl eingestellt.

4.2.6 *E. coli* Transformation zur Gewinnung fungaler ITS-Regionen von *Pneumocystis jirevecii*

Pneumocystis jirevecii ist in Laboratorien nicht oder nur sehr aufwändig kultivierbar. DNA erhält man u.a. durch Isolierung der Spezies aus Patientenproben wie Trachealsekret oder BAL. Da während der Anfertigung dieser Arbeit nicht ausreichend DNA aus Probenmaterialien vorlag, wurde die ITS-Region dieser Spezies synthetisch durch die Firma Genscript hergestellt. Die ITS-Regionen, flankiert durch die veröffentlichten ITS-Primer ITS 1 und ITS 4 von *Pneumocystis jirevecii* wurden in den Vektor pUC57 eingebracht. Dieser Vektor enthält eine Ampicillinresistenz zur späteren Selektionierung in *Escherichia coli*.

4.2.6.1 Transformation kompetenter DH5- α *E. coli*-Zellen

Die lyophilisierten Plasmide wurden nach Angaben des Herstellers in *Aqua moleculare* gelöst, während die bei -80°C gelagerten kompetenten DH5- α *E. coli*-Zellen 20 Minuten auf Eis auftauten. Je 5 ng Plasmid wurde in je 100 μl *E. coli*-Zellsuspension überführt und der Transformationsansatz weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Für den notwendigen Hitzeschock zur Aufnahme der Fremd-DNA wurden die Reaktionsgefäße 1 Minute bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis, wurden je 900 μl LB-Medium zu den Transformationsansätzen gegeben und diese bei 37°C für 45 Minuten schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 1:2 mit LB-Medium verdünnt und je 100 μl auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diesen Selektionsplatten wachsen nur transformierte *E. coli*-Zellen, da lediglich diese über eine Ampicillin-Resistenz verfügen. Einzelkolonien wurden in LB-Ampicillin-Flüssigmedium überimpft und bei 37°C und 160 upm über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Plasmide aus den *E. coli*-Zellen isoliert.

4.2.6.2 Plasmid-Präparation zur Gewinnung synthetischer DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten DH5- α *E. coli*-Zellen wurde das Plasmid Maxi Kit von QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet (vgl. Tabelle 5). Die gewonnene Plasmid-DNA enthält die gewünschte synthetische DNA und dient als Template für die PCR.

4.2.7 Amplifikation von Zielsequenzen mittels Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation von Zielgenen bzw. Zielsequenzen erfolgt durch die Polymerasekettenreaktion (PCR). Durch unterschiedliche Temperaturen wird die DNA zunächst denaturiert, es entstehen DNA-Einzelstränge. Die Verwendung von revers komplementären Primern erlaubt eine Vervielfältigung gewünschter Zielsequenzen. Die Zielsequenz wird von den Primersequenzen flankiert und während der sich wiederholenden Reaktionszyklen exponentiell amplifiziert. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche PCR-Verfahren eingesetzt: *Singleplex-PCR* und *Multiplex-PCR*, *Gradienten-PCR* und *Nested-PCR*.

4.2.7.1 *Singleplex-PCR*

Durch die Verwendung eines einzelnen Primerpaares wird bevorzugt ein Amplifikat gebildet. Durch die Verwendung Pilz-universeller Primer, können Zielsequenzen der Pilze mit nur einem Primerpaar vervielfältigt werden. Verwendet wurden die veröffentlichten panfungalen ITS-Primer ITS 1, ITS 2, ITS 3 und ITS 4 (White *et al.*, 1990). Durch das Primerpaar ITS 1+4 wird die gesamte ITS-Region amplifiziert. Unter Verwendung der Primerpaare ITS 1+2 und ITS 3+4 werden jeweils die ITS-Spacer 1 und ITS-Spacer 2 amplifiziert (vgl. 3.5.2.1). Sofern nicht anders angegeben, wurde die *Singleplex-PCR* nach folgenden Protokollen durchgeführt (vgl. Tabelle 11, Tabelle 12).

Tabelle 11: Singleplex-PCR

PCR-Protokoll: 25 µl Ansatz	Volumina (µl)	Konzentration im Endvolumen von 25 µl
<i>Aqua moleculare</i>	12,95	
5X GoTaq® Green Reaction Buffer	5,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,25	0,5 mM jeweils
Primer _{forward} (10 µM)	1,0	0,4 µM
Primer _{reverse} (10 µM)	1,0	0,4 µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0,3	1,5 u
DNA	1,0	30 ng

Tabelle 12: Cycler-Protokoll Singleplex-PCR

Temperatur	Schritte	Zeit
95°C	Initiale Denaturierung	2 Minuten
95°C	Denaturierung	30 Sekunden
56,6°C	Annealing	30 Sekunden
72°C	Extension	1 Minute 30 Sekunden
72°C	Finale Extension	5 Minuten
4°C	Kühlung	1 Minute
20°C		∞

} 30 Zyklen

4.2.7.2 Gradienten-PCR

Durch den Einsatz einer *Gradienten-PCR* kann eine optimale Annealing-Temperatur der verwendeten Primer mittels Temperaturgradienten identifiziert werden. Im Falle dieser Arbeit wurde ein Gradient von 50 °C bis 74 °C für das Annealing der veröffentlichten ITS-Primer gewählt. Es wurden 12 gleiche PCR-Ansätze bei folgenden Temperaturen amplifiziert: 50,0 °C, 50,6 °C, 52,1 °C, 53,8 °C, 56,6°C, 60,0 °C, 64,0 °C, 67,4°C, 70,1 °C, 72,0 °C, 73,5 °C und 74,0 °C (vgl. Tabelle 13, Tabelle 14).

Tabelle 13: Gradienten-PCR

PCR-Protokoll: 25 µl Ansatz	Volumina (µl)	Konzentration im Endvolumen von 25 µl
<i>Aqua moleculare</i>	12,95	
5X GoTaq® Green Reaction Buffer	5,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,25	0,5 mM jeweils
Primer _{forward} (10 µM)	1,25	0,5 µM
Primer _{reverse} (10 µM)	1,25	0,5 µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0,125	0,6 u
DNA (30 ng/µl)	1,0	30 ng

Tabelle 14: Cycler-Protokoll Gradienten-PCR

Temperatur	Schritte	Zeit
95°C	Initiale Denaturierung	30 Sekunden
95°C	Denaturierung	10 Sekunden
50 °C – 74 °C	Annealing	15 Sekunden
72°C	Extension	1 Minute 15 Sekunden
72°C	Finale Extension	5 Minuten
7°C	Kühlung	∞

} 30 Zyklen

4.2.7.3 Multiplex-PCR

Im Falle einer *Multiplex-PCR* werden mehr als zwei Primer eingesetzt. Es können dadurch mehrere Produkte simultan in einer PCR entstehen. Dies hat den Vorteil, dass bspw. unterschiedliche Zielsequenzen innerhalb einer PCR vervielfältigt werden können. Unter Verwendung aller vier veröffentlichten, panfungalen ITS-Primer in einer PCR wird neben den beiden ITS-Spacern 1 und 2 auch die gesamte ITS-Region vervielfältigt. Es entstehen drei PCR-Produkte. Sofern nicht anders angegeben, wurde die *Multiplex-PCR* nach folgenden Protokollen durchgeführt (vgl. Tabelle 15, Tabelle 16).

Tabelle 15: Multiplex-PCR

PCR-Protokoll: 25 µl Ansatz	Volumina (µl)	Konzentration im Endvolumen von 25 µl
<i>Aqua moleculare</i>	10,95	
5X GoTaq® Green Reaction Buffer	5,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,25	0,5 mM jeweils
Primer _{forward1} (10 µM)	1,0	0,4 µM
Primer _{reverse1} (10 µM)	1,0	0,4 µM
Primer _{forward2} (10 µM)	1,0	0,4 µM
Primer _{reverse2} (10 µM)	1,0	0,4 µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0,3	1,5 u
DNA	1,0	30 ng

Tabelle 16: Cycler-Protokoll der Multiplex-PCR

Temperatur	Schritte	Zeit
95°C	Initiale Denaturierung	2 Minuten
95°C	Denaturierung	30 Sekunden
56,6°C	Annealing	30 Sekunden
72°C	Extension	1 Minute 30 Sekunden
72°C	Finale Extension	5 Minuten
4°C	Kühlung	1 Minute
20°C		∞

} 35 Zyklen

4.2.7.4 Nested-PCR

Die *Nested-PCR* setzt sich aus zwei aufeinander folgenden Polymerase-Kettenreaktionen zusammen. In der ersten PCR der *Nested-PCR* wird ein längerer Sequenzabschnitt amplifiziert. Das Primerpaar der sich anschließenden zweiten PCR der *Nested-PCR* verfügt über Bindestellen, die innerhalb des ersten PCR-Produktes liegen. Es wird ein kleineres PCR-Produkt gebildet. Der große Vorteil der *Nested-PCR* ist die Sensitivität: Durch die vorgeschaltete Vervielfältigung eines – im Vergleich zum Gesamtgenom der Pilze – definierten und kleineren Sequenzabschnittes liegen von diesem nach der ersten panfungalen PCR viele Kopien vor. Diese dienen als Template für die zweite PCR, in der wesentlich mehr PCR-Produkt gebildet werden können als ohne vorgeschaltete panfungale PCR. Die Methode der *Nested-PCR* wurde bereits an klinischen Proben erfolgreich getestet. Untersucht wurden Proben auf *Candida* spp., *Aspergillus* spp. und *Fusarium* spp. Es konnte eine sehr hohe Sensitivität von bis zu ein bis zwei diploiden *Candida albicans*-Zellen festgestellt werden (Jaeger *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde die *Nested-PCR* mit den veröffentlichten ITS-Primern durchgeführt. Es handelt sich dabei sowohl bei der ersten als auch der zweiten PCR um panfungale Amplifikationsreaktionen. In der ersten PCR wurde mittels der Primer ITS 1+4 die gesamte ITS-Region amplifiziert. In der zweiten PCR wurde das Primerpaar ITS 1+2 oder ITS 3+4 verwendet, um die jeweiligen Spacer ITS1 und ITS2 zu amplifizieren. Die Sensitivität wurde über Auftragen der Produkte der zweiten PCR auf ein Agarosegel sowie durch Hybridisierungen ermittelt. Sofern nicht anders angegeben, wurde die *Nested-PCR* nach folgenden Protokollen durchgeführt (vgl. Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19).

Tabelle 17: Erste PCR der *Nested-PCR*. Die Konzentration der DNA im Endvolumen variiert zwischen 10^0 bis 10^5 DNA-Molekülen. Die DNA stammt aus seriellen DNA-Verdünnungsreihen.

PCR-Protokoll: 25 μ l Ansatz	Volumina (μ l):	Konzentration im Endvolumen von 25 μ l
<i>Aqua moleculare</i>	11,95	
5X GoTaq® Green Reaction Buffer	5,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,25	0,5 mM jeweils
Primer _{forward} (10 μ M): ITS 1	1,0	0,4 μ M
Primer _{reverse} (10 μ M): ITS 4	1,0	0,4 μ M
HeLa-DNA (100 ng/ μ l)	1,0	100 ng
GoTaq® DNA Polymerase (5u/ μ l)	0,3	1,5 u
DNA	1,0	Je nach DNA-Molekülzahl der eingesetzten DNA

Tabelle 18: Zweite PCR der *Nested-PCR*

PCR-Protokoll: 25 μ l Ansatz	Volumina (μ l):	Konzentration im Endvolumen von 25 μ l
<i>Aqua moleculare</i>	12,95	
5X GoTaq® Green Reaction Buffer	5,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,25	0,5 mM jeweils
Primer _{forward} (10 μ M)	1,0	0,4 μ M
Primer _{reverse} (10 μ M)	1,0	0,4 μ M
GoTaq® DNA Polymerase (5u/ μ l)	0,3	1,5 u
Template (Erstes <i>Nested PCR</i> -Produkt)	1,0	

Tabelle 19: Cycler-Protokoll der ersten und zweiten PCR der *Nested-PCR*

Temperatur	Schritte	Zeit
95°C	Initiale Denaturierung	2 Minuten
95°C	Denaturierung	30 Sekunden
56,6°C	Annealing	30 Sekunden
72°C	Extension	1 Minute 30 Sekunden
72°C	Finale Extension	5 Minuten
4°C	Kühlung	1 Minute
20°C		∞

} 30 Zyklen

4.2.7.5 Vergleich von *Singleplex*- und *Multiplex-PCR* sowie *Nested-PCR*

Durch die Verwendung des Primerpaars ITS 1+4 wird die gesamte ITS-Region amplifiziert. Dabei entstehen PCR-Produkte unterschiedlicher Größe, da die ITS-Region der einzelnen Spezies unterschiedlich lang ist. Mit 377 bp repräsentiert *Candida pulcherrima* unter den 56 fungalen Spezies, die in dieser Arbeit identifiziert werden sollen, die kleinste und *Candida glabrata* mit 880 bp die größte ITS-Region. Durch die Primerpaare ITS 1+2 und ITS 3+4 werden die ITS-Spacer 1 und 2 amplifiziert. Unter Verwendung aller vier ITS-Primer innerhalb einer *Multiplex-PCR* werden die ITS-Spacer 1 und 2 simultan amplifiziert. Zusätzlich entsteht in dieser Reaktion noch ein drittes PCR-Produkt: das Produkt des Primerpaars ITS 1+4. Bei der *Nested-PCR* wird zunächst in der ersten PCR der *Nested-PCR* die gesamte ITS-Region durch das Primerpaar amplifiziert. In der sich anschließenden zweiten PCR der *Nested-PCR* werden entweder der ITS-Spacer 1 oder 2 amplifiziert. Das etablierte *PCR-Array-System* wurde hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität durch *Single*- und *Multiplex-PCR* sowie *Nested-PCR* untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen (vgl. 5.5.3 und 5.7.4). Sofern nicht anders angegeben, wurden die *Singleplex*- und *Multiplex-PCR* bereits genannten Protokollen durchgeführt (vgl. Tabelle 11, Tabelle 15, Tabelle 17 und Tabelle 18).

4.2.8 Sequenzierung

Durch die Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge eines Gens oder des gesamten Genoms entschlüsselt. Diese Basenabfolge kann mit bereits öffentlich zugänglichen Sequenzen verglichen werden. Um sicherzugehen, dass es sich bei den Referenzstämmen, die bei DSMZ, CBS und ATCC bestellt wurden, um die richtige Spezies handelt, wurden die ITS-Region mit dem veröffentlichten Primerpaar ITS 1 und ITS 4 (vgl. Tabelle 10) amplifiziert. Sofern nicht anders angegeben, wurde die PCR für die spätere Sequenzierung nach folgenden Protokollen durchgeführt (vgl. Tabelle 20, Tabelle 21).

Tabelle 20: PCR-Protokolle für Sequenzierproben

PCR-Protokoll: 25 µl Ansatz	Volumina (µl):	Konzentration im Endvolumen von 25 µl
H ₂ O (<i>Aqua moleculare</i>)	10,95 µl	Keine Angabe
5x GoTaq® Green Reaction Buffer	5,00 µl	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,50 µl	2,5 mM
dNTP-Mix (je 10 mM)	1,25 µl	je 50 µM
Primer _{forward} (10 µM): ITS 1	0,50 µl	0,2 µM
Primer _{reverse} (10 µM): ITS 4	0,50 µl	0,2 µM
GoTaq® DNA Polymerase (5 u/µl)	0,30 µl	1,5 u
Template-DNA	1,00 µl	30 ng

Tabelle 21: Cyclor-Protokoll für Sequenzierungen

Temperatur	Schritte	Zeit
95°C	Initiale Denaturierung	2 Minuten
95°C	Denaturierung	30 Sekunden
56,6°C	Annealing	30 Sekunden
72°C	Extension	1 Minute 30 Sekunden
72°C	Finale Extension	5 Minuten
4°C	Kühlung	1 Minute
20°C		∞

} 30 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden mittels QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (vgl. Tabelle 5). Zur Elution der DNA wurden 25 µl aqua molekulare verwendet. Das Eluat wurde insgesamt zweimal auf die Säule gegeben. Die Proben wurden durch die Firma GATC (GATC Biotech AG, Konstanz, D) in beide Richtungen, d.h. beginnend mit Primer ITS 1, sowie beginnend mit Primer ITS 4 in 5'-3'-Richtung sequenziert. Die Ergebnisse der beiden Sequenzierungen wurden miteinander und mit den öffentlich zugänglichen Sequenzen von NCBI verglichen (Standard Nucleotide BLAST). Zudem wurden die Sequenzen in die eigens etablierten Datenbanken für die Sondenentwicklung mittels der Software *ARB* aufgenommen.

4.2.9 Fluoreszenzmarkierte Primer für die Synthese fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte

Durch den Einsatz Cy3-markierter Primer werden die PCR-Produkte fluoreszenzmarkiert. Cyanin 3 ist einer der am meisten eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe, wenn es um Markierungen von Nukleinsäuren geht. Die höchste Fluoreszenzausbeute wird erreicht, indem Cy3 an den 5'-Terminus der Einzelstrang DNA gebunden wird (Sanborn *et al.*, 2007) (vgl. Abbildung 11). Aus diesem Grund und aus Gründen der Stabilität der Markierung des Cy3s wurden Cy3-5'-markierte Primer verwendet, um die PCR-Produkte zu markieren. Die Fluoreszenzausbeute des einzelsträngig-gebundenen Cy3s ist sogar um ein 2,4-faches höher, wenn der Einzelstrang durch seinen komplementären Strang zur Doppelstrang-DNA vervollständigt wird, was dem schlussendlich vorliegenden PCR-Amplifikat entspricht. Cy3 wird durch Licht mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt (Sanborn *et al.*, 2007). Das emittierte Licht kann anhand des EUROIMMUN Microarray-Scanners erfasst werden.

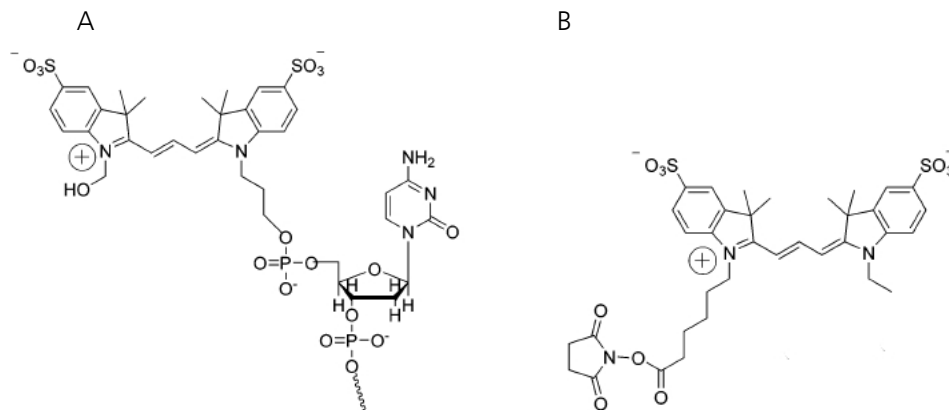


Abbildung 11: Strukturen von Cy3. A: Cy3-5'-DNA. B: freies Cy3 (modifiziert nach (Sanborn *et al.*, 2007))

4.2.10 Gelelektrophorese

Zur Visualisierung von PCR-Amplifikaten wird das PCR-Produkt durch ein Agarosegel aufgetrennt. Hierfür wird in dieser Arbeit ein 2,4%-iges (w/v) Agarosegel verwendet, welches mit TAE-Elektrophoresepuffer angesetzt wird. Bei dieser Agarosekonzentration lassen sich geringe Basenunterschiede präzisieren. Nach Aufkochen der Agarose-TAE-Lösung wird diese unter fließendem kaltem Wasser heruntergekühlt, bis sie handwarm ist. Anschließend werden 5 µl Midori Green Advanced je 50 ml Agarosegel zugegeben. Durch Schwenken wird der Farbstoff im gesamten Gel verteilt und dieses in den Gelschlitten gegossen. Für die Bestimmung von PCR-Produktgrößen werden 5 µl 100 bp-Marker verwendet. Von den zu visualisierenden DNA-Proben werden je 5 µl in die Taschen des Gels aufgetragen. Da die PCR-Proben mit 5x GoTaq® Green Reaction Buffer angesetzt werden, ist kein zusätzlicher Ladepuffer notwendig. Die Auftrennung erfolgt bei 150 V für 45 Minuten. Zur Visualisierung der gefärbten PCR-Produkte wird das Gel unter UV-Licht an der Camilla High Resolution Digital Camera fotografiert.

4.2.11 Sondendesign

In dieser Arbeit sollen 56 fungale humanpathogene Spezies eindeutig über kurze Oligonukleotidsequenzen, DNA-Sonden, identifiziert werden. Für das Design speziesspezifischer Sonden sind viele Kriterien und Parameter wichtig. Hierzu gehören geeignete Zielsequenzen innerhalb des Genoms der Pilze und der Vergleich der Sequenzen, um das Sonden- und Primerdesign zu ermöglichen. Für das Sonden- und Primerdesign sind Parameter wie Länge, GC-Gehalt, Schmelztemperatur sowie die Position der Oligonukleotidsequenz in der Zielregion und einzigartige Merkmale der Sequenzen für die jeweiligen Spezies entscheidend.

4.2.11.1 Auswahl geeigneter Zielsequenzen für das speziesspezifische Sondendesign

Für die Diskriminierung und Identifizierung humanpathogener Hefe- und Schimmelpilze sind geeignete Zielsequenzen entscheidend. Diese müssen über evolutionär konservierte sowie sehr variable Regionen verfügen. Konservierte Sequenzen erlauben das Design universeller fungaler Primerpaare für die Amplifikation der Zielsequenzen aller 56 Spezies mit nur wenigen Primerpaaren. Variable Regionen, die von den evolutionär konservierten Bereichen flankiert werden, eignen sich hervorragend für eine Diskriminierung und adäquate Identifizierung diverser Spezies. Eine wichtige und auch für die Selektion der Zielsequenzen entscheidende Rolle spielt die Sequenzverfügbarkeit der Zielsequenzen in der öffentlich zugänglichen Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), auf die beim Sondendesign für diese Arbeit zurückgegriffen wurde. Je mehr sequenzierte Daten der Zielsequenzen der einzelnen humanpathogenen Pilze vorliegen, desto aussagekräftiger gestaltet sich das sich anschließende *in silico*-Sondendesign.

4.2.11.2 Etablierung eigener Datenbanken

Aus den NCBI-Einträgen der sechs Zielgene-/sequenzen von 56 fungalen Spezies wurden eigene Datenbanken etabliert. Je Spezies und Zielsequenz wurden unter Verwendung des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) identische sowie sehr ähnliche bis weniger ähnliche Sequenzen identifiziert. Die Gesamtheit dieser Suchergebnisse wurde in eigene Datenbanken aufgenommen. Damit stehen sie für Vergleiche sowie Sonden- und Primerdesign zur Verfügung.

4.2.11.3 *In silico*-Sondendesign mittels ARB

Das *in silico*-Sondendesign wurde in dieser Arbeit mithilfe der frei zugänglichen Linux-Software ARB, das am Lehrstuhl für Mikrobiologie und der Fakultät für Informatik an der Technischen Universität München entwickelt wurde, durchgeführt (Ludwig *et al.*, 2004). Es erlaubt den Import eigener Datenbanken sowie bereits etablierter SILVA-Datenbanken (Pruesse *et al.*, 2007). Innerhalb dieser Datenbanken ist ein Alignieren der Sequenzen möglich. Dies erlaubt das Auffinden von Sequenzunterschieden innerhalb der Zielsequenzen. Sequenzunterschiede entstehen bspw. durch Insertionen oder Deletionen.

Für das speziespezifische Sondendesign steht die *Probe Design*-Option zur Verfügung. Parameter wie Länge, GC-Gehalt und Schmelztemperatur einer Sonde können hier definiert und angepasst werden. Sie sind die wichtigsten Werkzeuge für ein speziespezifisches Sondendesign. Der GC-Gehalt gibt die Anzahl an Cytosin- und Guanin-Basen innerhalb der Sondensequenz wieder. Er beeinflusst zudem die Schmelztemperatur der Sonde. Aufgrund der stabileren Bindung von Guanin- und Cytosinbasen durch drei Wasserstoffbrückenbindungen - die Basen Adenin und Thymin paaren sich lediglich durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen - spielt der GC-Gehalt eine wichtige Rolle für die Stabilität der Bindung während/nach der Hybridisierung. Standardisiert fand das Sondendesign mit folgenden Parametereinstellungen statt: Länge 25 bp, GC-Gehalt 55%, Schmelztemperatur 55 °C. Da es sich bei 56 Spezies um eine sehr hohe Anzahl an Spezies handelt, die es über ein bis maximal zwei Sonden zu diskriminieren galt, mussten die Parameter bei Bedarf angepasst werden. Länge, GC-Gehalt und Schmelztemperatur wurden mittels *Oligoanalyzer* von Integrated DNA Technologies ermittelt.

Innerhalb der *Probe Design*-Funktion gibt es zwei weitere Parameter: *group hits* und *non group hits*. Ein *group hit* bezeichnet einen Eintrag einer Sequenz in NCBI und demnach auch in der importierten Datenbank für die zu identifizierende Spezies. Ein Wert von 100% zeigt an, dass die Sonde in 100% der Einträge für die ausgewählte Spezies vorkommt. Bei einem *non group hit* handelt es sich um einen Eintrag einer Spezies, die es mit der Sonde nicht zu identifizieren gilt. Diese Option ist sehr hilfreich hinsichtlich falsch-annotierter Sequenzen innerhalb der NCBI-Datenbank.

Die Nukleotidabfolge und Länge der Sonde sowie die Lage und Anzahl an Basenfehlpaarungen zu anderen Spezies sind entscheidend für die Spezifität der Sonde. Je mehr Basenfehlpaarungen eine Sonde zu anderen Spezies aufweist, desto höher ist die Diskriminierungskraft. Sind Basenfehlpaarungen über die ganze Sondenlänge vertreten, verfügt die Sonde über eine höhere Diskriminierungskraft als eine Sonde

mit weniger Basenfehlpaarungen, die bspw. am Rand der Sonde liegen (Letowski *et al.*, 2004). Handelt es sich lediglich um eine Basenfehlpaarung, so sollte sich diese mittig innerhalb der Sondensequenz befinden, um noch diskriminierend zu sein. Guanin- oder Cytosin-Basen zu Beginn und Ende der Sequenz erhöhen zudem die Diskriminierungskraft der Sonden. Ebenso erlaubt die *Probe Match*-Funktion eine sequenzgenaue Betrachtung der Oligonukleotid-Sonden für eine Beurteilung der Diskriminierungskraft. Zusätzlich wurden die Sonden mittels BLAST auf ihre Spezifität überprüft. Das Sondendesign konnte zudem auf bestimmte Bereiche eingeschränkt werden. Beim Redesign der Sonden für eine Spezies spielte dies eine wichtige Rolle. Zeigte die Sonde unspezifische oder zu geringe Signalintensitäten, konnte das Redesign sofern möglich außerhalb dieses Bereiches stattfinden. Aufgrund der sehr hohen Zahl an zu diskriminierenden Spezies war das Sondendesign oft auf einen sehr kleinen Bereich beschränkt. Signalintensitäten lassen sich in diesem Fall nur durch Verlängerungen bestehender Sonden ggf. realisieren, ohne (weitere) Unspezifitäten hervorzurufen. Die entwickelten Sonden wurden durch die Firma EUROIMMUN kontaktlos auf Glasträger gespottet und diese auf Hartplastik-Träger transferiert. Neben diesen Objektträgern stammen Hybridisierungspuffer HB-A, Hybridisierungsschablone, Hybridisierungsstation, Waschreagenzien WR1 und WR2 sowie der Arrayscanner von der Firma EUROIMMUN.

4.2.12 Hybridisierung fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte

Fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte verfügen über Sequenzen, die das gegenläufige Komplement der Sondensequenz darstellen. 5 µl PCR-Produkt werden zur Überprüfung der PCR auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die verbleibenden 20 µl werden mit 65 µl Hybridisierungspuffer HB-A durch Pipettieren homogenisiert und 80 µl auf die Hybridisierungsschablone übertragen. Die Hybridisierungsschablone ist eine Glasplatte zum Auftragen der Hybridisierungsproben. Die DNA-Mikroarray-Objektträger werden anschließend auf die Schablone gelegt, sodass ein Kontakt zwischen Hybridisierungsproben und Sonden des Arrays entsteht. Pro Schablone können bis zu 25 Proben simultan hybridisiert werden. Der Hybridisierungspuffer HB-A enthält Kontrolloligonukleotide. Sie hybridisieren an Kontrollsonden auf dem Mikroarray und geben Aufschluss darüber, ob die Hybridisierung funktioniert hat. Dabei handelte es sich um Positionskontrollen an der linken unteren und rechten oberen Ecke der Arrays sowie um eine *perfect match*-Sonde sowie dieselbe Sondensequenz mit zwei mittig platzierten Basenfehlpaarungen. Unter einer *perfect match*-Sonde versteht man eine Sonde, die zu der Kontrolloligonukleotid-Sequenz im Hybridisierungspuffer keinerlei Basenfehlpaarungen aufweist und ein hohes Fluoreszenzsignal liefert. Die Hybridisierung findet bei 50°C für eine Stunde statt. Anschließend wird die Hybridisierungslösung durch kurzes Überführen der Objektträger in Waschlösung 1 abgewaschen. Die Objektträger werden ebenfalls in Waschlösung 1 für eine Minute auf dem Horizontalschüttler bei niedrigster Stufe gewaschen. Waschlösung 2 enthält eine geringere Salzkonzentration als Waschlösung 1. Die Objektträger verbleiben 2 Minuten darin bevor sie für mindestens 5 Sekunden in Waschlösung 3 mit niedrigster Salzkonzentration gewaschen werden. Ungebundene PCR-Produkte werden durch diese Waschschrte mit abnehmender Salzkonzentration entfernt. Anschließend werden die Objektträger mit der Stickstoffpistole trocken geblasen.

Neben DNA einzelner Spezies wurden PCR-Negativkontrollen, bei denen Wasser als Template in die PCR eingesetzt wurden, hybridisiert. Dies gab Aufschluss darüber, dass die verwendeten Reagenzien - hinsichtlich fungaler DNA - kontaminationsfrei waren. Wurden in vereinzelt Fällen Signale ermittelt, konnten diese bei den Spezies-Hybridisierungen, die dasselbe Wasser enthielten, nicht festgestellt werden. Demnach rührten diese Signale sehr wahrscheinlich von einer Kontamination der Wasser-Negativkontrolle selbst her.

4.2.13 Signaldetektion

Die Sonden-gebundenen Cy3-markierten PCR-Produkte, die während des Waschvorganges nicht von den Objektträger entfernt wurden, können durch Laserlicht angeregt werden (vgl. 4.2.9). Dies erfolgt in einem Scanner der Firma EUROIMMUN. Das emittierte Licht der Sonden wird erfasst und quantifiziert. Zudem findet eine Korrektur des Hintergrundsignals statt. Alle Signale, die eine Intensität von über 1000 a.u. aufweisen, werden als Signal betrachtet. Dieser Schwellenwert wurde empirisch ermittelt. Mithilfe eines virtuellen Gitters, das über die Arrays gelegt wird, kann man die Spots den jeweiligen Sonden zuordnen (vgl. Abbildung 12). Die Signalintensitäten der Duplikatsspots eines Mikrorrays wurden für die Auswertungen gemittelt und als ein Replikatswert betrachtet. Ein zweiter Wert wurde durch das technische Replikat ermittelt, wodurch der Mittelwert der beiden Replikatswerte und die zugehörige Standardabweichung berechnet werden konnten.

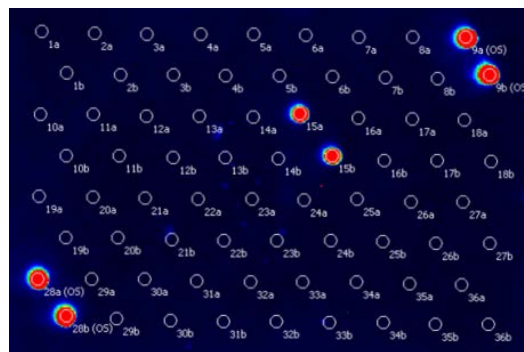


Abbildung 12: Aufnahme eines hybridisierten und gescannten Arrays mit aufgelegtem Auswertungsgitter. Oben rechts und unten links: Rote Fluoreszenzsignale der in Duplikaten gespotteten Kontrollsonden. Die Fluoreszenzsignale der Duplikatsspots fast mittig repräsentieren Signale einer spezifischen Sonde, die nach Hybridisierung der zugehörigen DNA fluoresziert.

4.2.14 Statistische Betrachtungen der Hybridisierungsergebnisse

Für eine statistische Auswertung der Hybridisierungsergebnisse werden die, durch Einzelspezies-Hybridisierungen ermittelten, SONDENSIGNALE in Richtig-Positive (RP), Falsch-Negative (FN), Richtig-Negative (RN) und Falsch-Positive (FP) Signale unterschieden. Bei RP-Signalen handelt es sich um Signale, die bei der Hybridisierung einer Spezies lediglich auf den zugehörigen Sonden dieser Spezies festzustellen sind. Werden Signale auf Sonden ermittelt, die nicht für die hybridisierte Spezies entwickelt wurden, handelt es sich bei diesem Signal um ein FP-Signal. Sind bei der Einzelspezies-Hybridisierung keine Signale auf der Spezies-zugehörigen Sonde festzustellen, handelt es sich um FN-Signale. Bei SONDENSIGNALEN unter 1.000 a.u., die von Sonden auf dem Mikroarray ausgehen, die nicht für die hybridisierte Spezies entwickelt wurden, handelt es sich um RN-Signale.

Anhand dieser Werte kann die Trefferquote des *PCR-Array-Systems* durch die Richtig-Positiv-Rate (RP-Rate) = $RP/(RP+FN)$ ermittelt werden. Dieser Wert gibt den prozentualen Anteil der richtig-positiv identifizierten Spezies an. Die RP-Rate ist auch unter dem Begriff Sensitivität gebräuchlich. In dieser Arbeit wird der Begriff Sensitivität jedoch für die Nachweisgrenze von DNA-Molekülen verwendet. Je weniger DNA-Moleküle einer Spezies vonnöten sind, um zu Signalen auf den zugehörigen Sonden des Mikroarrays zu führen, desto höher ist die Sensitivität des *PCR-Array-Systems*. Neben der RP-Rate kann zudem die Spezifität des *PCR-Array-Systems* durch die Richtig-Negativ-Rate (RN-Rate) = $RN/(RN+FP)$ berechnet werden. Dieser Wert gibt die Wahrscheinlichkeit darüber an, wie häufig eine fehlende DNA einer Spezies tatsächlich negativ detektiert wurde. Der positive Vorhersagewert (PV-Wert) = $RP/(RP+FP)$ gibt Aufschluss über das Verhältnis der richtig-positiv gewerteten Signale zu der Gesamtheit der ermittelten Signale über 1.000 a.u. Bewertet werden die Signalintensitäten der technischen Replikate, die bei der Hybridisierung einzelner Spezies auftreten. Sofern ein Replikatswert der Duplikate Intensitäten auf Spezies spezifischen Sonden unter 1.000 a.u. aufweist, fließt dieses Ergebnis als FN-Signal in die Bewertung ein.

5 Ergebnisse

Die Diagnostik fungaler Infektionen in klinischen Laboratorien basiert oftmals auf zeitintensiven kulturbasierten Nachweisverfahren, die zudem in unspezifischen Klassifikationen resultieren können. Für eine adäquate und zeitnahe Therapieeinleitung ist eine sensitive und spezifische Identifizierung der humanpathogenen Pilzspezies notwendig. Durch DNA-Mikroarray-Analysen ist eine simultane Überprüfung verschiedener Erreger-DNAs innerhalb weniger Stunden möglich. Die Erreger-DNAs wurden zuvor aus Patientenproben isoliert und mittels PCR amplifiziert. Dies kann schlussendlich durch rechtzeitiges Einsetzen einer gezielten Therapie zu einer erhöhten Lebenserwartung immunsupprimierter Patienten beitragen und unerwünschte Nebenwirkungen sowie Resistenzentwicklungen gegen Antimykotika mindern. In dieser Arbeit wurde ein *PCR-Array-System* für die Identifizierung von 56 humanpathogenen Pilzspezies für die klinische Diagnostik entwickelt.

5.1 Detektionsspektrum des DNA-Mikroarrays: Hefe- und Schimmelpilzspezies

In Zusammenarbeit der Universität Stuttgart, des Fraunhofer IGB Stuttgart und des HDZ Nordrhein-Westfalen (Prof. Dr. med. Knabbe und Dr. rer. nat. Jan Weile) wurden 56 humanpathogene Spezies festgelegt, die mittels DNA-Oligonukleotidsonden unterschieden werden sollen. Die Diskriminierung spielt vor allem bei resistenten Spezies eine große Rolle, da dies für den Therapieerfolg entscheidend ist. *Candida glabrata* verfügt beispielsweise über intrinsische Resistenzen gegen Fluconazole (Bennett *et al.*, 2004), wohingegen andere *Candida* Spezies sensitiv auf die Gabe dieses Antimykotikums reagieren. Die 56 zu diskriminierenden Spezies wurden nach klinischer Relevanz ausgesucht. Neben solchen, die eine Fungämie auslösen können und somit im Blut von Intensivpatienten zu finden sein können, umfasst das Detektionsspektrum Spezies, die in respiratorischen Sekreten oder auf Haut und Schleimhäuten zu finden sind. Zudem sind Spezies mit endemischem Hintergrund vertreten (vgl. Tabelle 22 und Tabelle 46 im Anhang): *Cryptococcus gattii* ist bspw. eine humanpathogene Spezies, die vermehrt auf Vancouver Island zu finden ist (Byrnes *et al.*, 2009a).

Tabelle 22: Spezies des FYI-Chips

<i>Absidia caerulea</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Pseudallescheria boydii</i>
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Candida famata</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
<i>Absidia cylindrospora</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Absidia glauca</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Dipodascus capitatus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Absidia spinosa</i>	<i>Candida kefyr</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Malassezia furfur</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>
<i>Arthroderma gypseum</i>	<i>Candida metapsilosis</i>	<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Arthroderma otae</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>	<i>Mucor plumbeus</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i>	<i>Trichophyton tonsurans</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Mucor racemosus</i>	<i>Trichosporon asahii</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Penicillium marneffeii</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Coccidioides posadasii</i>	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	<i>Trichosporon mucoides</i>

5.1.1 Synonyme der 56 humanpathogenen Hefe- und Schimmelpilzspezies

Aufgrund von Um- und Mehrfach-Benennungen vieler Pilzspezies existieren oftmals verschiedene Namen für ein und dieselbe Art. Allein die Unterscheidung in Teleomorphe und Anamorphe lässt häufig zwei Namen einer Spezies parallel existieren. Für die Entwicklung eines Mikroarrays zur Detektion von 56 humanpathogenen Pilzspezies ist es wichtig alle Synonyme der fungalen Spezies zu kennen. Da die Entwicklung eines DNA-Arrays, im Falle dieser Arbeit, mit einer Suche innerhalb der NCBI-Datenbank beginnt, müssen bereits zu diesem Zeitpunkt Synonyme der 56 Spezies bekannt sein, um eine gezielte Suche durchführen zu können. Es konnten insgesamt 252 Synonyme identifiziert werden (vgl. Tabelle 47 im Anhang).

5.2 Auswahl geeigneter Zielsequenzen für die Identifizierung fungaler Spezies

Für die Identifizierung von 56 Pilzspezies wurden auf der genomischen DNA Zielregionen gewählt, die sowohl über flankierende konservierte Sequenzbereiche verfügen, als auch evolutionsbedingt sequenzvariable Bereiche untereinander aufweisen. Dem ribosomalen Cluster zugehörig sind die Zielgene für die kleine und große ribosomale Untereinheit (SSU, LSU) sowie die Zielsequenzen der *Internal transcribed spacer* (ITS) Region (vgl. 3.5.2.1). Die ITS-Region des ribosomalen Genclusters gilt in der medizinischen Mykologie als sehr dienliche Zielregion für die Speziesidentifizierung (Korabecna, 2007). Sie weist eine sehr hohe Evolutionsrate und demnach eine hohe Varianz zwischen Spezies eines Genus auf (White et al., 1990). Neben Sequenzen des ribosomalen Clusters wurden weitere Zielgene für das Sondendesign ausgewählt: Die Gensequenzen für Calmodulin (Cal), das als Kalzium-Bindeprotein eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen von Eukaryoten spielt (Paranjape et al., 1990), sind bereits für die Speziesdetektion beschrieben (Mulè et al., 2004). Sequenzen des Gens für β -Tubulin (β tub) werden ebenfalls für phylogenetische Analysen von Pilzen verwendet (Einax, 2003). Während der Proteinsynthese spielt ausschließlich in fungalen Zellen der Translations-Elongationsfaktor 3 (EF-3) eine essentielle Rolle (Ypma-Wong et al., 1992) und wird demnach als Identifikationsmerkmal für Pilze herangezogen.

Diese sechs Zielgene wurden auf ihre Diskriminierungs- und Identifizierungseigenschaften für die 56 ausgewählten fungalen Spezies untersucht. Entscheidend war dabei zunächst die Sequenzverfügbarkeit der Zielsequenzen in der öffentlichen Datenbank von NCBI. Je mehr Sequenzen einer Spezies vorliegen, umso aussagekräftiger gestaltet sich das *in silico*-Sonden- und Primerdesign. Unter einem Eintrag innerhalb der NCBI-Datenbank versteht sich eine sequenzierte Nukleotidabfolge des Zielgens. Je mehr Einträge pro Spezies vorhanden sind, desto mehr Sequenzen können miteinander verglichen werden. Das Sondendesign wird dadurch aussagekräftiger. Je mehr Spezies viele Einträge der Zielsequenz aufweisen, desto verlässlicher diskriminieren die *in silico* entwickelten Sonden bei der Hybridisierung (vgl. Tabelle 23 und Tabelle 48 im Anhang).

Tabelle 23: Sequenzverfügbarkeit der Zielgene in NCBI. Je mehr Einträge sequenzierter Daten für eine Spezies vorliegen, desto aussagekräftiger ist das *in silico* Sondendesign (Höchstzahl der Einträge je Spezies). Eine gute Aussagekraft des Designs ist ab zehn Einträgen je Spezies und Zielgen gegeben. Die Anzahl der Spezies, die mindestens zehn und mehr Einträge je Zielgen aufweisen sind unter *Anzahl der Spezies mit Höchstzahl Einträge > 10* gelistet. Eine detaillierte und speziesspezifische Sequenzverfügbarkeit findet sich im Anhang in Tabelle 48.

	ITS	SSU	LSU	βtub	EF-3	Cal
Sequenzverfügbarkeit in NCBI	56/56	42/56	34/56	36/56	25/56	22/56
Höchstzahl der Einträge je Spezies	334	77	61	168	10	133
Anzahl der Spezies mit Höchstzahl Einträge > 10	50/56	14/56	9/56	6/56	9/56	1/56

Aufgrund der NCBI-Datenlage zeigte sich deutlich, dass die Sequenzverfügbarkeit der *Internal transcribed spacer* Region (ITS) am größten ist. Von allen 56 Spezies sind Sequenzen verfügbar. Zudem sind viele Spezies vertreten, die über eine hohe Zahl an Einträgen sequenzierter ITS-Sequenzen verfügen. Dies stellte eine sehr gute Grundlage für das Sonden- und Primerdesign dar. Um möglichst große Chancen für die Identifizierung Spezies spezifischer Sonden zu erhalten, wurden Sonden und Primer für alle ausgewählten Zielsequenzen und -Gene entwickelt. ITS-Sonden konnten für alle Spezies entwickelt werden. Für einzelne Spezies wurden zudem Sonden und speziesspezifische Primer innerhalb der fünf weiteren Zielgene entwickelt, um eine erhöhte Spezifität zu erzielen.

5.3 Etablierung eigener Datenbanken

Nach der zuvor beschriebenen Methode wurden für die Zielgene Calmodulin, β-Tubulin, Elongationsfaktor 3 und für die eukaryotische ITS-Region Datenbanken etabliert (vgl. 4.2.11.2). Datenbanken für die Zielgene der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit (SSU und LSU) waren öffentlich zugänglich: SILVA Database SSUref release 104 für die kleine ribosomale Untereinheit und SILVA Database LSUref 1900 für die große ribosomale Untereinheit (Pruesse *et al.*, 2007). In Summe befanden sich 27.825 Einträge in den Datenbanken (vgl. Tabelle 24). Diese standen nach Sequenzalignment mittels der Software *ARB* für das Sonden- und Primerdesign zur Verfügung.

Tabelle 24: Größe der Datenbanken der jeweiligen Zielgene anhand der Zahl der Einträge

	ITS	SSU	LSU	β-tub	EF-3	Cal
Einträge je Datenbank	11429	6532	2388	4703	221	2552
Summe Einträge	27.825					

5.4 Auswahl der ITS-Region als Zielregion für die Identifizierung

Für die Identifizierung und Diskriminierung von 56 fungalen Spezies wurden insgesamt 566 unterschiedliche Sonden (Sense- und Antisense-Sonden) aller sechs Zielsequenzen entworfen, gespottet (vgl. Tabelle 49 im Anhang) und mit Cy3-markierten PCR-Produkten hybridisiert. Die Sensitivität und Spezifität des *PCR-Array-Systems* wurden für jede Sonde überprüft. Davon befanden sich 380 Sonden innerhalb der *Internal transcribed spacer*-Region des ribosomalen Clusters, 82 Sonden in der großen ribosomalen Untereinheit (LSU), 58 Sonden in der kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU), 18 Sonden innerhalb der codierenden Sequenz für den Elongationsfaktor 3, 16 Sonden in der Gensequenz für Calmodulin und 12 Sonden in der β -Tubulin-Gensequenz.

Zur Überprüfung der entwickelten Sonden wurden insgesamt 74 Primer getestet. Es handelte sich dabei um Primer für alle sechs Zielgene. Davon waren 16 Primersequenzen bereits veröffentlicht und 58 Primer wurden selbst entwickelt (vgl. Tabelle 51 und Tabelle 52 im Anhang). Zur Überprüfung der Amplifikationseigenschaften wurden *Singleplex-PCR* durchgeführt (vgl. 4.2.7.1). Sofern PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung ermittelt werden konnten, wurden die Sonden und die Spezifität des *PCR-Array-Systems* durch Hybridisieren der Cy3-markierten Amplifikate überprüft (Daten nicht gezeigt). Zeigten Sonden eine unzureichende Diskriminierungskraft, d.h. sie traten als unspezifisches Signal bei der Hybridisierung anderer Spezies auf oder es waren Signalintensitäten unter dem Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. festzustellen, war das Sondendesign nicht erfolgreich. Bei erfolgreichem Sondendesign wurden zudem *Multiplex-PCR* durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Da sich die meisten Sonden in der ITS-Region befanden, wurden die *Multiplex-PCR* mit den vier veröffentlichten panfungalen Primer ITS 1, ITS 2, ITS 3 und ITS 4 (White *et al.*, 1990) sowie speziesspezifischen Primern für Sonden in der SSU und LSU aufgebaut. Sonden innerhalb dieser Zielsequenzen sollten zu einer erhöhten Spezifität des *PCR-Array-Systems* beitragen. Es konnten allerdings nicht alle PCR-Produkte, die anhand der Ergebnisse der *Singleplex-PCR* zu erwarten gewesen wären, innerhalb der *Multiplex-PCR* amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Ein Spezifikationszugewinn durch speziesspezifische Primerpaare und Sonden in den Zielsequenzen für SSU und LSU war demnach nicht gegeben.

Die vier veröffentlichten panfungalen Primer ITS 1, ITS 2, ITS 3 und ITS 4 (White *et al.*, 1990) führten dagegen sowohl durch *Singleplex-PCR* als auch durch *Multiplex-PCR* zu den erwarteten PCR-Produkten. Die Primerbindestellen befinden sich außerhalb der ITS-Region und flankieren diese (ITS 1 und ITS 4) bzw. befinden sich gegenläufig komplementär zueinander in der 5.8S des ribosomalen Clusters (ITS 2 und ITS3; vgl. Abbildung 10). Durch die *Singleplex-PCR* mit den Primerpaaren ITS 1+2, ITS 3+4 und ITS 1+4 wurde bevorzugt je ein PCR-Produkt gebildet, es entstanden keine bis kaum unspezifische Nebenprodukte (vgl. jeweils Spur 1 in Abbildung 14). Unter Verwendung der vier ITS-Primer in einer *Multiplex-PCR* wurden bevorzugt drei PCR-Produkte gebildet, die jeweils auch während der *Singleplex-PCR* mit den einzelnen Primerpaaren gebildet wurden (Daten nicht gezeigt). Das finale *PCR-Array-System* bestand letztendlich aus 96 ITS-Sonden (vgl. Tabelle 50 im Anhang) und vier veröffentlichten Primern ITS 1, ITS 2, ITS 3 und ITS 4 (vgl. Tabelle 10). 14 Sense- und Antisense-Sonden decken dabei mehr als eine Spezies ab (vgl. Abbildung 28). Dieses ausschließlich auf Sequenzen der *internal transcribed spacer*-Region des ribosomalen Clusters

basierende *PCR-Array-System* zeigte die höchste Spezifität für die ausgewählten 56 humanpathogenen Pilzspezies.

5.5 Etablierung von Polymerasekettenreaktionen mit ITS-Primern

Für die Identifizierung von 56 fungalen Spezies wurden die veröffentlichten Primer ITS 1, ITS 2, ITS 3 und ITS 4 gewählt (vgl. Abbildung 10, Tabelle 10). Diese wurden in unterschiedliche PCR-Methoden eingesetzt, um die optimale Annealing-Temperatur festzulegen und ihre Kompatibilität mit humaner DNA und fungaler Referenz-DNA zu überprüfen. Die optimale Annealing-Temperatur spielt für die Effizienz der PCR eine wichtige Rolle. Ist die Temperatur zu niedrig oder zu hoch, wird weniger bis kein Produkt gebildet. Zudem können unspezifische Primer-Bindungen und Amplifikationen unterbunden werden. Hinsichtlich einer klinischen Anwendung des Mikroarrays spielt humane DNA in Patientenprobe eine große Rolle. Die Primer sollten die humane DNA nicht amplifizieren, um negative Auswirkungen auf die PCR oder Kreuzhybridisierungen zu verhindern. Zudem sollten die panfungalen ITS-Primer die ITS-Region aller 56 Spezies amplifizieren und dies mit hohen spezifischen Produktausbeuten möglichst ohne Nebenprodukte. Die PCR-Produkte dienen als Hybridisierungstemplate und sind mitentscheidend für die Spezifität und Sensitivität des *PCR-Array-Systems*.

5.5.1 Gradienten-PCR

Zur Festlegung der optimalen Annealing-Temperatur wurde mit dem Primerpaar ITS 1 und ITS 4 eine Gradienten-PCR durchgeführt. Exemplarisch für alle Spezies ist das Ergebnis für *Candida tropicalis* gezeigt. Getestet wurden 12 Temperaturschritte von 50 °C bis 74 °C (vgl. 4.2.7.2). Temperaturschritt 5 repräsentiert das PCR-Produkt unter Einsatz einer Annealing-Temperatur von 56,6 °C. Diese Temperatur wurde als optimale Annealing-Temperatur festgelegt. Quantitativ bemessen wurde bei dieser Temperatur am meisten PCR-Produkt gebildet. Geringere Annealing-Temperaturen wurden aus Spezifitätsgründen nicht ausgewählt.

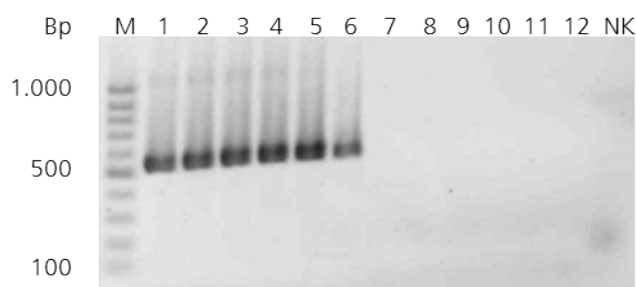


Abbildung 13: Ergebnis der Gradienten-PCR für *Candida tropicalis*. Verwendet wurde das Primerpaar ITS 1 + ITS 4. M = 100 bp DNA-Marker in 100 bp-Schritten. 1-12: Temperaturschritte von 50 °C bis 74 °C. PCR-Produkte von einer ungefähren Größe von 500-600 bp sind bei den Temperaturschritten 1-6 zu verzeichnen. Das qualitativ bemessen stärkste PCR-Produkt wurde bei Temperaturschritt 5 (56,6 °C) ermittelt.

5.5.2 Amplifikationstest mit humaner DNA

Neben fungaler DNA befindet sich auch humane DNA in Patientenproben. Eine Amplifikation der humanen DNA ist nicht erwünscht. Die veröffentlichten ITS-Primer wurden deswegen hinsichtlich ihrer Amplifikationsspezifität mit humaner DNA getestet. Verwendet wurde DNA der humanen HeLa-Zelllinie sowie das Standard-Protokoll für die *Singleplex-PCR* (vgl. 4.2.7.1, Tabelle 11). Als Positivkontrolle wurden 30 ng DNA von *Candida albicans* eingesetzt (Spur 1). Getestet wurden die Primerpaare ITS 1+2, ITS 3+4 und ITS 1+4 mit je 100 ng HeLa-DNA (Spur 2). Wasser diente als Negativkontrolle (Spur 3). Die Primerpaare funktionierten sehr gut mit DNA von *C. albicans*, es war ein PCR-Produkt in der richtigen Größe zu erkennen. Alle getesteten Primerpaare zeigten keine Amplifikationen mit HeLa-DNA (vgl. Abbildung 14). Banden kleiner als 100 bp sind den Primern zuzuordnen und stellen kein PCR-Produkt dar (vgl. Abbildung 14 Spur 2 und 3). Zudem waren keine Amplifikationen der HeLa-DNA unter gemeinsamer Verwendung der vier ITS-Primer innerhalb einer *Multiplex-PCR* zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt).

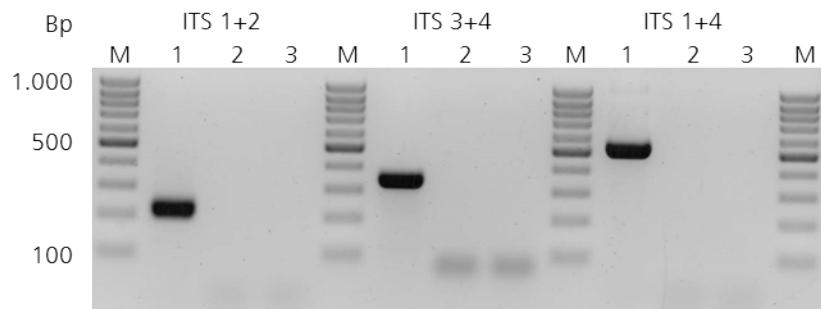


Abbildung 14: Primertest mit humaner DNA. Verwendet wurden die Primerpaare ITS 1+2, ITS 3+4 und ITS 1+4. M = 100 bp DNA-Marker in 100 bp-Schritten. Spur 1 = Positivkontrolle DNA von *C. albicans*. Spur 2 = HeLa-DNA. Spur 3 = Negativkontrolle. Es waren keine Amplifikate der HeLa-DNA bei allen verwendeten Primerpaaren zu verzeichnen.

5.5.3 Vergleichsstudie von *Singleplex-* und *Multiplex-PCR*

Um das *PCR-Array-System* sowohl auf Spezifität als auch auf Sensitivität zu testen, wurden unterschiedliche *PCR-Protokolle* untersucht und miteinander verglichen. Die *Singleplex-PCR* fand dabei nach dem Standard-Protokoll statt (vgl. Tabelle 11) und wurde mit 35 statt 30 Amplifikationszyklen durchgeführt (vgl. Tabelle 12). Je nach Lage der Sonden wurde entweder Spacer ITS1 oder ITS2 amplifiziert. Hierbei handelte es sich jeweils um die Primerpaare ITS 1+2 oder ITS 3+4. Die gesamte ITS-Region wurde durch das Primerpaar ITS 1+4 ebenfalls in einer *Singleplex-PCR* amplifiziert. Die *Multiplex-PCR* wurde nach den Standard-Protokollen (vgl. Tabelle 15, Tabelle 16) mit den ITS Primern ITS1+2+3+4 durchgeführt. Es wurden je 30 ng fungale DNA eingesetzt. Die Hybridisierung fand nach dem Standard-Protokoll statt (vgl. 4.2.12). Es wurden ausschließlich Sonden des finalen Protokolls berücksichtigt und jeweils technische Duplikate generiert. Die Signalintensitäten der Replikate wurden gemittelt und die Standardabweichung dieser berechnet.

5.5.3.1 Ergebnisse der Vergleichsstudie ohne unspezifische Signale

Nach dem Hybridisieren fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte einer definierten Spezies, spricht man von einem spezifischen Signal, wenn ausschließlich die Sonden für die jeweilige Spezies zu Signalen führen. Für jede Spezies wurden die PCR-Produkte der *Singleplex-PCR* - durchgeführt mit dem Primerpaar ITS 1+4, als auch mit den Primerpaaren ITS 1+2 oder ITS 3+4 - und der *Multiplex-PCR* hybridisiert. Auf diese Weise wurde DNA von 52 Spezies amplifiziert und die Ergebnisse verglichen. Die ermittelten Signalintensitäten wurden unterteilt in niedrigstes (+), mittleres (++) und höchstes Signal (+++) für die unterschiedlichen PCR, die mit DNA derselben Spezies durchgeführt wurden. 26 Spezies zeigten bei allen drei Protokollen ausschließlich spezifische Signale. Bei mehr als der Hälfte dieser Spezies waren die höchsten Signalintensitäten durch das Protokoll mit den ITS-Primern ITS 1+2 oder ITS 3+4 ermittelt worden, gefolgt von den Signalintensitäten, die durch die *Multiplex-PCR* festgestellt wurden. Die Signalintensitäten, die durch die Hybridisierung der gesamten ITS-Region ermittelt wurden, zeigten in 20 Fällen die geringsten sowie in sechs Fällen mittlere Signalintensitäten (vgl. Tabelle 25 und Tabelle 53 im Anhang).

Tabelle 25: Ergebnisse der Vergleichsstudie ohne unspezifische Signale. Die Tabelle zeigt die eine Einteilung der Signalintensitäten der spezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies. Signale, die durch die drei PCR-Protokolle erreicht wurden, sind nach ihrer Intensität in geringste Intensität (+), mittlere Intensität (++) und höchste Intensität (+++) für jede Spezies unterteilt.

Spezies	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>
	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
<i>Candida famata</i>	+++	++	+
<i>Candida krusei</i>	+++	++	+
<i>Candida pulcherrima</i>	+++	++	+
<i>Mucor racemosus</i>	+++	++	+
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	+++	++	+
<i>Sporothrix schenckii</i>	+++	++	+
<i>Candida tropicalis</i>	+++	+	++
<i>Mucor pusillus</i>	+++	+	++
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	+++	+	++
<i>Rhizopus microsporus</i>	+++	+	++
<i>Rhodotorula minuta</i>	+++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+++	+	++
<i>Candida dubliniensis</i>	+++	+	++
<i>Candida guilliermondii</i>	+++	+	++
<i>Candida parapsilosis</i>	+++	+	++
<i>Candida albicans</i>	++	+	+++
<i>Candida glabrata</i>	++	+	+++
<i>Candida lusitanae</i>	++	+	+++
<i>Candida metapsilosis</i>	++	+	+++
<i>Candida orthopsilosis</i>	++	+	+++
<i>Dipodascus capitatus</i>	++	+	+++
<i>Epidermophyton floccosum</i>	++	+	+++
<i>Mucor hiemalis</i>	++	+	+++
<i>Penicillium marneffeii</i>	++	+	+++
<i>Pseudallescheria boydii</i>	++	+	+++
<i>Trichosporon mucoides</i>	++	+	+++

5.5.3.2 Ergebnisse der Vergleichsstudie mit unspezifischen Signalen

Im Idealfall sollten nach der Hybridisierung der Cy3-markierten PCR-Produkte einer einzelnen Spezies lediglich die speziesspezifischen Sonden, die eigens für diese entwickelt wurden, zu Signalen führen. Waren weitere Signale auf Sonden für andere Spezies festzustellen, handelte es sich um unspezifische Signale. Durch die Verwendung der *Multiplex-PCR* wurden zwar spezifische SONDENSIGNALE mit einer hohen Intensität detektiert, allerdings zeigten sich bei diesem Protokoll zudem die höchsten Signalintensitäten unspezifischer Sonden. Nach Hybridisierung der gesamten ITS-Region hingegen ließen sich nur sehr wenige unspezifische SONDENSIGNALE verzeichnen, wobei die spezifischen Sonden ebenfalls nur geringe Intensitätswerte aufwiesen. Durch die Amplifizierung und Hybridisierung kurzer ITS-Fragmente, wie sie durch Verwendung der Primer ITS 1+2 bzw. ITS 3+4 entstanden, waren für 13 Spezies Intensitäts-Höchstwerte auf den spezifischen Sonden festzustellen. Verglichen mit den Ergebnissen der *Multiplex-PCR* trat nur eine Unspezifität mit Intensitätshöchstwerten auf (vgl. Tabelle 26 und im Tabelle 54 im Anhang).

Tabelle 26: Ergebnisse der Vergleichsstudie von *Single-* und *Multiplex-PCR* mit unspezifischen Signalen. Die Tabelle zeigt die Einteilung der Signalintensitäten der spezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies. Signale, die durch die drei PCR-Protokolle erreicht wurden, sind nach ihrer Intensität in geringste Intensität (+), mittlere Intensität (++) und höchste Intensität (+++) für jede Spezies unterteilt. Grau unterlegte Felder repräsentieren das Protokoll mit der höchsten Signalintensität unspezifischer Sonden. Zeigen mehrere unspezifische Sonden die maximale Intensität nach Verwendung unterschiedlicher Protokolle, sind mehrer Felder innerhalb einer Spezies grau unterlegt.

Spezies	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>
	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
<i>Absidia cylindrospora</i>	+++	+	++
<i>Absidia glauca</i>	+++	+	++
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	+++	+	++
<i>Rhizopus oryzae</i>	+++	+	++
<i>Trichophyton rubrum</i>	+++	+	++
<i>Trichosporon cutaneum</i>	+++	+	++
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	+++	+	++
<i>Candida kefyr</i>	+++	++	+
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+++	++	+
<i>Trichosporon asahii</i>	+++	++	+
<i>Trichosporon asteroides</i>	+++	++	+
<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	+++	++	+
<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i>	+++	++	+
<i>Absidia caerulea</i>	++	+	+++
<i>Absidia spinosa</i>	++	+	+++
<i>Arthroderma gypseum</i>	++	+	+++
<i>Aspergillus niger</i>	++	+	+++
<i>Aspergillus terreus</i>	++	+	+++
<i>Fusarium solani</i>	++	+	+++
<i>Malassezia furfur</i>	++	+	+++
<i>Mucor plumbeus</i>	++	+	+++
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	++	+	+++
<i>Cryptococcus gattii</i>	++	+	+++
<i>Aspergillus flavus</i>	+	++	+++
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	++	+++
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+	++	+++

5.5.3.3 Statistische Betrachtung der Vergleichsstudie von *Single-* und *Multiplex-PCR*

Für eine statistische Betrachtung der unterschiedlichen PCR-Methoden und um diese miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten Signale in RP-, FP-, FN- und RN-Signale eingeteilt sowie die RP-Rate und RN-Rate berechnet. Die RP-Rate gibt den Anteil der richtig identifizierten Spezies an. Dieser Wert ist bei dem Protokoll der *Singleplex-PCR* mit den Primerpaaren ITS 1+2 bzw. ITS 3+4 am höchsten (vgl. Tabelle 27).

Tabelle 27: Statistische Bewertung der Vergleichsstudie von *Single-* und *Multiplex-PCR*. Gezeigt ist die Anzahl richtig-positiver Signale (RP), falsch-positiver Signale (FP), falsch-negativer Signale (FN), richtig-negativer Signale (RN) und das prozentuale Ergebnis der Richtig-Positiv-Rate (RP-Rate) der Hybridisierungsergebnisse nach Amplifikation fungaler DNA durch die Protokolle der *Singleplex-PCR* mit den Primerpaaren ITS 1+2 oder ITS 3+4 bzw. ITS 1+4 und der *Multiplex-PCR* mit den Primern ITS 1+2+3+4.

	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>
	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
RP	110	106	112
FP	18	42	1
FN	4	7	70
RN	5176	5304	5304
RP-Rate	96 %	94 %	62 %

Das Protokoll zur Amplifizierung kurzer PCR-Fragmente durch die Primerpaare ITS 1+2 oder ITS 3+4 mittels *Singleplex-PCR* zeigte bezüglich der Spezifität die besten Ergebnisse (vgl. Tabelle 53 und Tabelle 54 im Anhang). Die RP-Rate zeigte zudem die höchste Wahrscheinlichkeit, dass die hybridisierten Spezies korrekt identifiziert wurden. Hinsichtlich der klinischen Anwendung des Mikroarrays für die Identifizierung der fungalen Spezies in Patientenproben würde die Verwendung dieses PCR-Protokolls allerdings bedeuten, dass die isolierte DNA der Patientenproben durch zwei Polymerasekettenreaktionen getestet werden müsste, um Sonden, die sich sowohl innerhalb des Spacers ITS1 als auch in Spacer ITS2 befinden, überprüfen zu können. Je nach Patientenprobe variiert die Zahl der fungalen Zellen bzw. nach DNA-Isolierung der fungalen DNA-Moleküle sehr stark. Oft sind sehr geringe Zahlen zu verzeichnen, weswegen es nicht wünschenswert ist eine Patientenprobe auf mehrere PCR aufzuteilen. Die Methode der *Multiplex-PCR*, die beide Amplifikationen vereint, konnte aufgrund der hohen Anzahl an Unspezifitäten nicht in Betracht gezogen werden.

5.6 Sensitivität durch *Nested-PCR*

Die Zahl der Pathogenzellen und demnach auch die Zahl der fungalen DNA-Moleküle in klinischen Proben ist oftmals sehr gering und kann unterhalb der Detektionsgrenze einiger PCR-Methoden liegen. Aus Gründen der hohen Sensitivität der *Nested-PCR* für fungale Spezies (Jaeger *et al.*, 2000) wurde diese Methode an das ITS-Primer-System angepasst und getestet (vgl. Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19). Um die Sensitivität der ITS-*Nested-PCR* zu überprüfen, wurde seriell verdünnte DNA von acht klinisch relevanten Spezies als Template sowie je 100 ng humane HeLa-DNA eingesetzt. In einer ersten PCR wurde die gesamte ITS-Region durch das Primerpaar ITS 1+4 amplifiziert. Die zweite PCR erfolgte mit den Primerpaaren ITS 1+2 bzw. ITS 3+4. Als Template wurde je 1 µl des PCR-Produktes aus der ersten PCR eingesetzt. Es wurden jeweils technische Duplikate hergestellt, die Signalintensitäten der Replikate gemittelt und die Standardabweichung dieser berechnet.

Getestet wurden 10^5 bis 10^0 DNA-Moleküle aus seriellen DNA-Verdünnungsreihen. Die DNA-Mengen wurden aus den Genomgrößen der Spezies und aus dem Molekulargewicht der DNA der Spezies ermittelt (http://www.molbiol.ru/ger/scripts/01_07.html). Spacer ITS1 verfügte über Sondensequenzen zur Identifizierung der Spezies *Aspergillus terreus*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* und *Candida tropicalis*. Spacer ITS2 verfügt über Sondensequenzen für *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* und *Candida glabrata*. Die Cy3-markierten PCR-Produkte beider PCR wurden mittels Agarosegel aufgetrennt und unter Standardbedingungen hybridisiert (vgl. 4.2.12).

5.6.1 Ergebnisse der *Nested-PCR* für Spezies innerhalb des Spacers ITS1

Exemplarisch für die Sensitivität der *Nested-PCR* für alle Spezies sind die Amplifikationsprodukte der ersten und zweiten PCR der Spezies *Aspergillus terreus* auf dem Agarosegel gezeigt (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 17). Das PCR-Produkt der gesamten ITS-Region hatte bei dieser Spezies eine *in silico* ermittelte Länge von 610 bp; dies konnte durch das auf dem Agarosegel ersichtliche Amplifikationsprodukt bestätigt werden. PCR-Produkte sind bei den DNA-Verdünnungsstufen 10^5 bis 10^3 DNA-Moleküle erkennbar, wobei die Bande bei 10^3 Molekülen sehr schwach zu sehen war. Die PCR wurde jeweils im Duplikat durchgeführt (linke und rechte Hälfte in Abbildung 15). Die Negativkontrollen der ersten PCR (NK1) zeigten keine Produkte auf dem Gel (vgl. Abbildung 15). Vergleichbare Ergebnisse der ersten PCR von *A. terreus* wurden ebenfalls auf den Agarosegelen der drei weiteren Spezies *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* beobachtet (Daten nicht gezeigt).

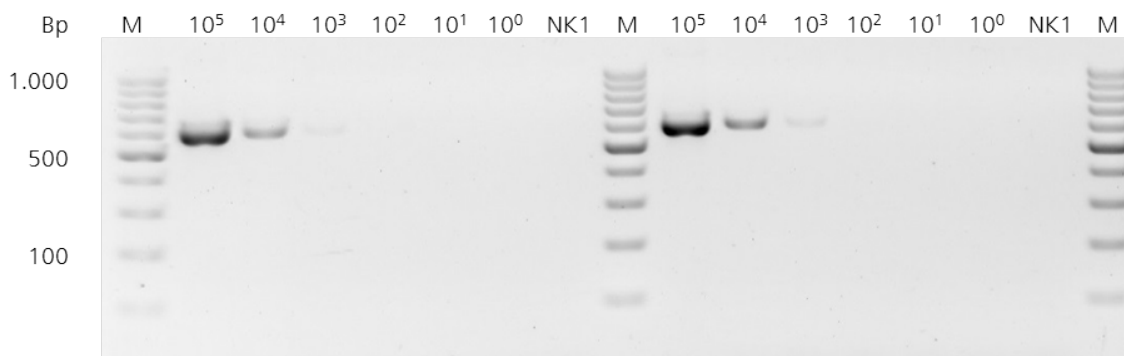


Abbildung 15: Geldokumentation der PCR-Produkte der ersten PCR der *Nested-PCR* von *A. terreus*. M = 100 bp DNA-Marker in 100 bp-Schritten. NK1 = Negativkontrolle der ersten PCR. Linke Hälfte: Replik 1, rechte Hälfte: Replik 2. Als Template für die PCR wurden 10^5 bis 10^0 DNA-Moleküle eingesetzt.

Die PCR-Produkte aller DNA-Verdünnungsstufen und die Negativkontrollen im Duplikat wurden hybridisiert. Spezifische Signale waren auf der Sonde für *Aspergillus terreus* bei 10^5 und 10^4 DNA-Molekülen festzustellen. Sie waren mit bis zu 1.475 a.u. bei einem DNA-Molekül im Vergleich zu 9.163 a.u. bei 10^5 Molekülen deutlich geringer und nahezu an der Detektionsgrenze von 1.000 a.u. Bei 10^5 Molekülen waren zudem für die Spezies unspezifische Signale auf einer weiteren Sonde L776__Asp_fumi_Lä ITS mit einer Intensität von 2.441 a.u. festzustellen. Bei allen weiteren Verdünnungsstufen waren keine Unspezifitäten feststellbar (vgl. Abbildung 16 und Tabelle 55 im Anhang).

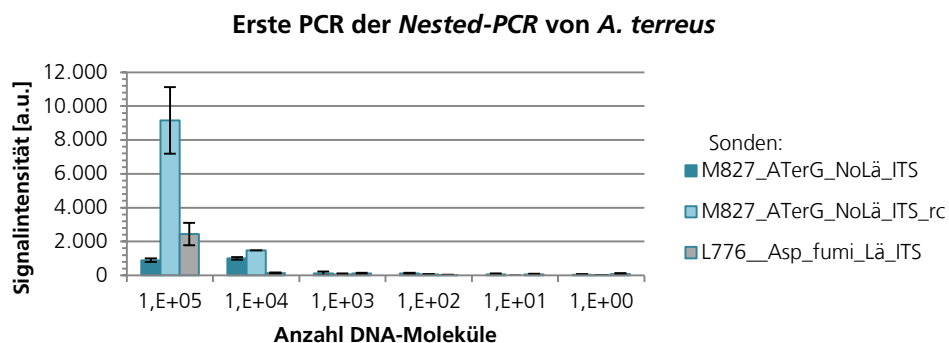


Abbildung 16: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der ersten PCR der *Nested-PCR* von *A. terreus*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$), die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten.

In der zweiten PCR erwartete man durch den Einsatz des Primerpaares ITS 1+2 anhand von *in silico* Daten PCR-Produkte mit einer Größe von 267 bp. Die Amplifikationsprodukte auf dem Agarosegel bestätigten dies. Es waren PCR-Produkte bei allen Verdünnungsstufen erkennbar, selbst bei 10^0 DNA-Molekülen. Die Negativkontrollen, die aus der ersten PCR stammten und ebenfalls in der zweiten eingesetzt wurden (NK1), zeigten PCR-Produkte auf dem Gel. Zudem war eine Doppelbande in Replik 2 bei 10^0 DNA-Molekülen erkennbar. Die Negativkontrollen der zweiten PCR (NK2) zeigten keine Produkte (vgl. Abbildung 17). Bei den Spezies *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* zeigten sich vergleichbare Amplifikationsprodukte auf den Agarosegelen: PCR-Produkte waren in NK2 und vereinzelt in Verdünnungsstufen eines Replikats festzustellen (Daten nicht gezeigt).

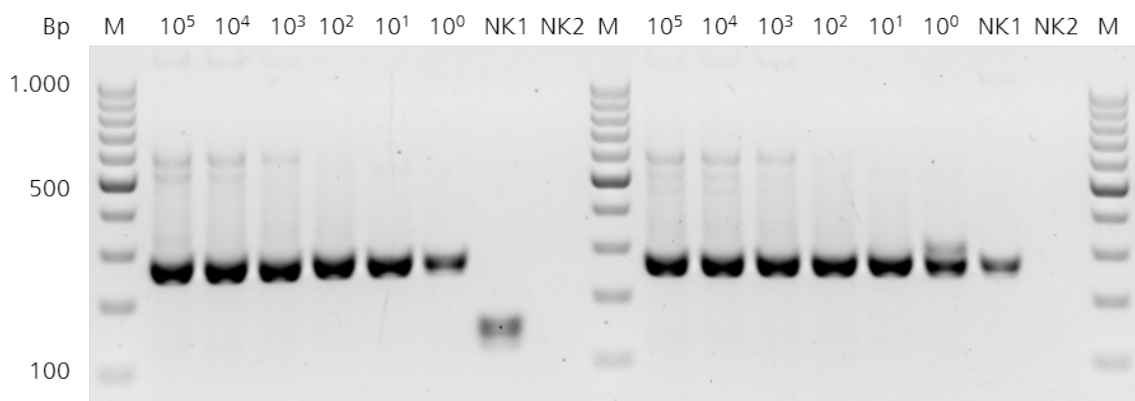


Abbildung 17: Geldokumentation der PCR-Produkte der zweiten PCR der Nested-PCR von *A. terreus*. M = 100 bp DNA-Marker in 100 bp-Schritten. Linke Hälfte: Replik 1, rechte Hälfte: Replik 2. Als Template für die PCR wurden 10^5 bis 10^0 DNA-Moleküle eingesetzt.

Die PCR-Produkte aller Verdünnungsstufen und die Negativkontrollen im Duplikat der zweiten Amplifikationsrunde wurden ebenfalls hybridisiert. Die PCR-Produkte in den Negativkontrollen führten zu keinerlei Signalintensitäten über 1.000 a.u. auf den Sonden des finalen Mikroarrays (Daten nicht gezeigt). Dies konnte ebenfalls für *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* festgestellt werden. Alle Verdünnungsstufen zeigten sehr hohe Intensitätswerte zwischen 27.964 a.u. bei 10^1 Molekülen bis zu 45.791 a.u. bei 10^5 Molekülen. Für alle vier Spezies innerhalb des Spacers ITS1 waren trotz unspezifischer Banden auf den Agarosegelen keine unspezifischen Signale zu verzeichnen (vgl. Tabelle 55 im Anhang).

Betrachtet man die Ergebnisse der zweiten PCR von *A. terreus* fällt auf, dass das Signal bei der Hybridisierung des PCR-Produktes eines DNA-Moleküls (10^0) diesmal nicht von der Antisense-Sonde ausging: Zeigte zuvor die Antisense-Sonde M827_ATerG_NoLä_ITS_rc das höchste Signal, ging das Signal bei einem Molekül von der Sense-Sonde M827_ATerG_NoLä_ITS aus (vgl. Abbildung 18 und Tabelle 55). Jede Sonde wurde in Sense- und Antisense-Konfiguration gespottet. Es ist bekannt, dass meist nur eine Sondenkonfiguration zu Signalen führt und nicht beide Sonden simultan leuchten (Chizhikov *et al.*, 2001). Ein ähnliches

Verhalten der Signalverlagerung von einer zur anderen Sondenkonfiguration, wurde von Dally *et al.* beschrieben und erklärt (Dally *et al.*, 2014).

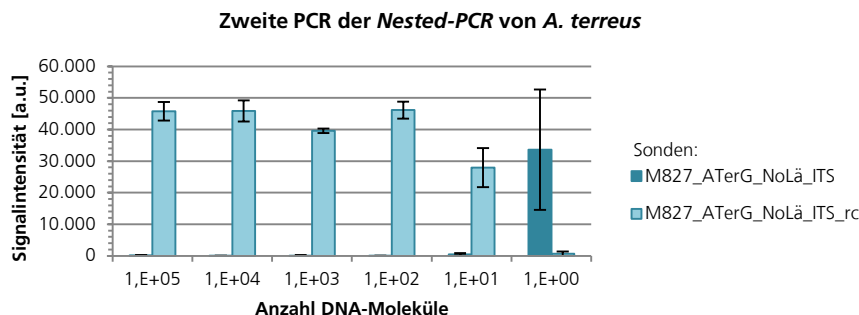


Abbildung 18: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der zweiten PCR der *Nested-PCR* von *A. terreus*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$), die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten.

Die *Nested-PCR* von *Candida krusei* verhielt sich sehr ähnlich zu der von *A. terreus*. Die erste PCR war mit Signalen bei bis zu 10^4 DNA-Molekülen nicht annähernd so sensitiv wie die zweite PCR. Hier waren bei zehn DNA-Molekülen noch Werte von knapp 50.000 a.u. festzustellen. Die Standardabweichungen bei einem DNA-Molekül waren sehr hoch und zeigten ähnliche Werte wie die Signalintensitäten selbst. Mit mehr als 51.000 a.u. bei 10^5 Molekülen befanden sich die Intensitäten nahezu an der oberen Detektions- bzw. Sättigungsgrenze. Wie bei *A. terreus* war bei der zweiten PCR von *C. krusei* ebenfalls eine Verschiebung des Sondensignals von der Antisense-Sonde M827_ATerG_NoLä_ITS_rc auf die Sense-Sonde M827_ATerG_NoLä_ITS zu beobachten (vgl. Abbildung 19 und Tabelle 56 im Anhang).

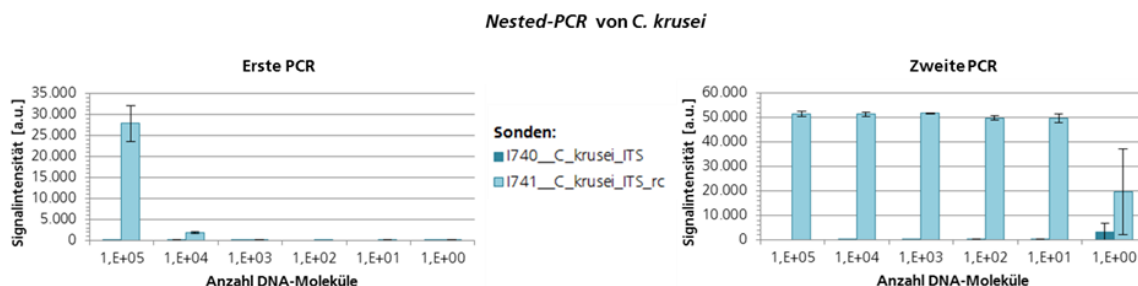


Abbildung 19: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *C. krusei*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$), die durch Hybridisierung der PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen (erste PCR) bzw. der zugehörigen PCR-Produkte der ersten PCR als Template (zweite PCR) ermittelt werden konnten.

Wurde die gesamte ITS-Region von *Candida parapsilosis* hybridisiert, waren lediglich bei der höchsten eingesetzten DNA-Menge (10^5 Moleküle) Signale auf der Sonde für diese Spezies festzustellen. Anders verhielt es sich, wenn die PCR-Produkte der ersten PCR in die zweite PCR eingesetzt wurden. Das dadurch entstandene kleinere PCR-Produkt hybridisierte ausschließlich an die für diese Spezies entwickelte Sonde und zeigte Intensitäten von 4.632 a.u. bei 10 Molekülen und 13.810 a.u. bei 10^5 Molekülen. Selbst bei einem DNA-Molekül waren Intensitäten von 8.233 a.u. festzustellen. Unspezifische Hybridisierungen wurden nicht nachgewiesen. Auch bei dieser Spezies war, wie bei den beiden Spezies zuvor, eine Verschiebung des Sondensignals zu beobachten: von der Antisense-Sonde I741__C_krusei ITS_rc auf die Sense-Sonde I740__C_krusei ITS (vgl. Abbildung 20 und Tabelle 57 im Anhang).

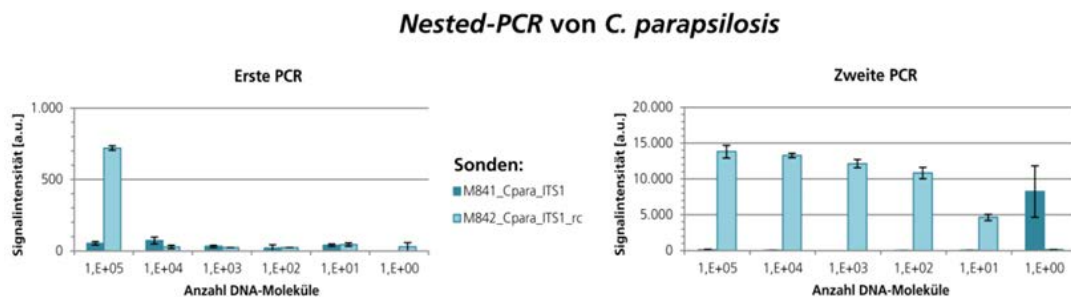


Abbildung 20: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *C. parapsilosis*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$), die durch Hybridisierung der PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen (erste PCR) bzw. der zugehörigen PCR-Produkte der ersten PCR als Template (zweite PCR) ermittelt werden konnten.

Die Hybridisierung der ersten PCR-Produkte von *Candida tropicalis* führte lediglich bei 10^5 DNA-Molekülen als Template zu Signalen auf dem Mikroarray. Es handelte sich dabei um die Sonde L831__Can_trop_Lä ITS_rc, die für *C. tropicalis* entwickelt wurde und eine Signalintensität von 5.666 a.u. aufwies. Zudem traten keine unspezifischen Signale auf. Eine hohe Sensitivität zeigte sich in der zweiten PCR. Bei 10 Molekülen konnte ein spezifisches Signal von über 21.000 a.u. festgestellt werden. Bei einem Molekül lag die Intensität bei knapp 5.000 a.u., jedoch lag der Werte der Standardabweichung verhältnismäßig hoch bei ca. 3.000 a.u. Neben der Antisense-Sonde konnten auch auf der Sense-Sonde L830__Can_trop_Lä ITS Signale von knapp 2.000 a.u. mit einer hohen Standardabweichung von 1.609 a.u. festgestellt werden (vgl. Abbildung 21 und Tabelle 59 im Anhang). Demnach zeigte nur eines der Replikate Signalintensitäten über dem Detektionsschwellenwert bei 1.000 a.u., das zweite Replikat wies ein falsch-negatives Signal auf.

Nested-PCR von *C. tropicalis*

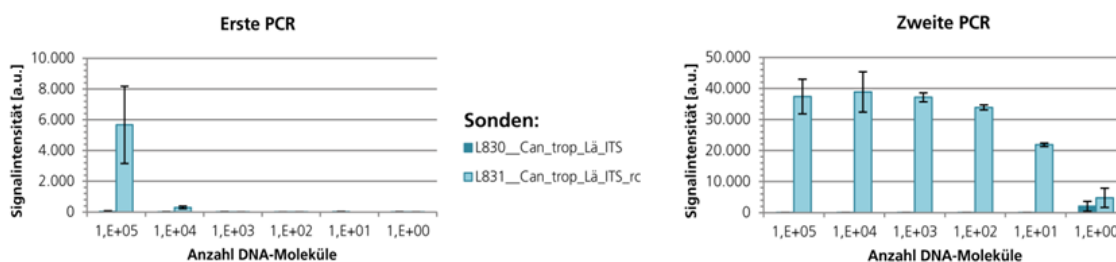


Abbildung 21: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *C. tropicalis*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$), die durch Hybridisierung der PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen (erste PCR) bzw. der zugehörigen PCR-Produkte der ersten PCR als Template (zweite PCR) ermittelt werden konnten.

5.6.2 Ergebnisse der *Nested-PCR* für Spezies innerhalb des Spacers ITS2

Exemplarisch für die Sensitivität der *Nested-PCR* für den Spacer ITS2 sind die Amplifikationsprodukte beider PCR für die Spezies *Aspergillus flavus* gezeigt (vgl. Abbildung 22 und Abbildung 23). Die *in silico* ermittelte Größe des PCR-Produkts der gesamten ITS-Region von 595 bp konnte durch das Amplifikationsprodukt auf dem Agarosegel bestätigt werden. PCR-Produkte der ersten PCR waren lediglich bei den DNA-Verdünnungsstufen 10^5 bis 10^3 erkennbar, wobei die Bande bei 10^3 Molekülen kaum noch zu erkennen war. Die Negativkontrollen zeigten keine Produkte auf dem Gel (vgl. Abbildung 22). Ähnlich verhielt es sich bei den drei weiteren untersuchten Spezies innerhalb des ITS2-Spacers *A. fumigatus*, *C. albicans* und *C. glabrata*. Lediglich die Sensitivität der ersten PCR von *C. glabrata* zeigte schlechtere Werte und lediglich bei der Verdünnungsstufe 10^5 PCR-Produkte auf dem Gel (Daten nicht gezeigt).

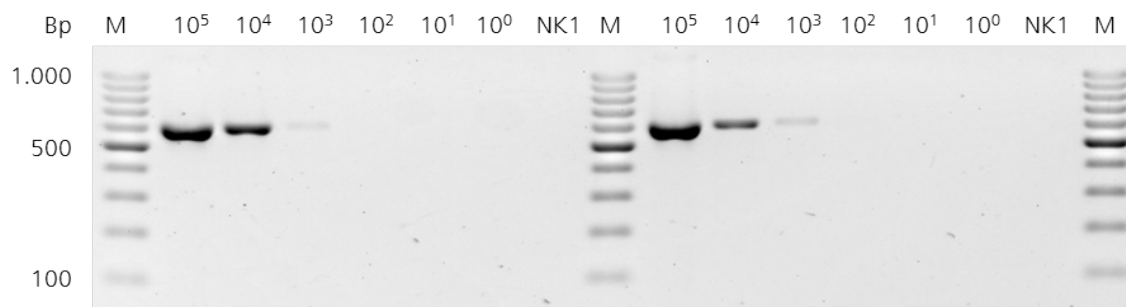


Abbildung 22: Geldokumentation der PCR-Produkte der ersten PCR der *Nested-PCR* von *A. flavus*. M = 100 bp DNA-Marker in 100 bp-Schritten. NK1 = Negativkontrolle der ersten PCR. Linke Hälfte: Replikat 1, rechte Hälfte: Replikat 2. Als Template für die PCR wurden 10^5 bis 10^0 DNA-Moleküle eingesetzt.

Je 1 µl des PCR-Produktes der ersten PCR wurde als Template in die zweite PCR mit dem Primerpaar ITS 3+4 eingesetzt. Das spezifische PCR-Produkt von 354 bp war auf dem Gel in den Verdünnungsstufen 10^5 bis 10^1 bzw. 10^0 in Replikat 2 erkennbar (vgl. rechte Hälfte in Abbildung 23). Neben diesen spezifischen PCR-Produkten waren viele nicht zuordenbare Produkte erkennbar. Die Menge dieser nahm mit Abnahme der spezifischen Produkte zu. Die Negativkontrolle, die aus der ersten PCR in die zweite übertragen wurde (NK1), wies ebenfalls nicht zuordenbare Produkte auf. Die Negativkontrollen der zweiten PCR alleine zeigten keinerlei Produkte (vgl. Abbildung 23). Diese Beobachtungen wurden ebenfalls bei den Spezies *A. fumigatus*, *C. albicans* und *C. glabrata* gemacht (Daten nicht gezeigt).

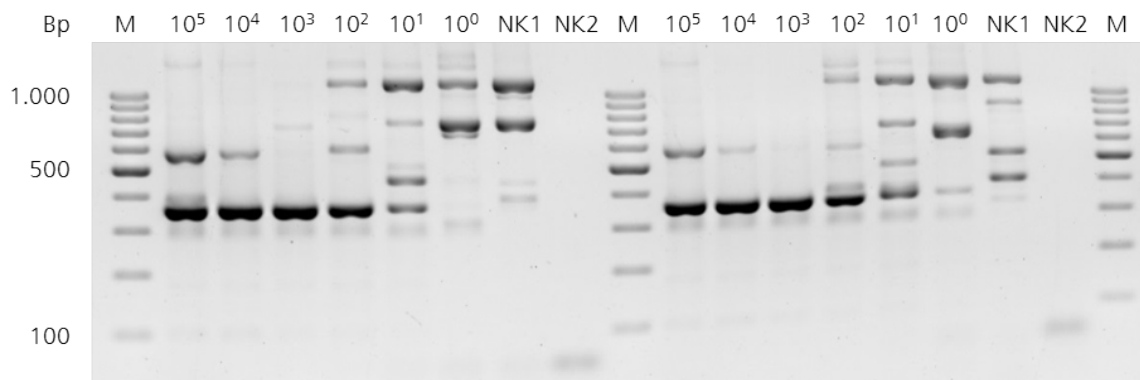


Abbildung 23: Geldokumentation der PCR-Produkte der zweiten PCR der Nested-PCR von *A. flavus*. M = 100 bp DNA-Marker in 100 bp-Schritten. Linke Hälfte: Replikat 1, rechte Hälfte: Replikat 2. Als Template für die PCR wurden 10^5 bis 10^0 DNA-Moleküle eingesetzt.

Alle Proben inklusive der Negativkontrollen wurden hybridisiert. Die nicht zuordenbaren PCR-Produkte der Negativkontrollen zeigten keine Signale auf dem Mikroarray. Dies konnte für die Spezies *A. fumigatus* und *C. albicans* ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ein Replikat des Versuches von *C. glabrata* zeigte nach Hybridisierung der Negativkontrolle NK2 ein Signal auf der Sonde für *Candida albicans* G986__Can_albi_ITS_rc mit einer Intensität von 1.488 a.u. (Daten nicht gezeigt).

Die DNA-Verdünnungsstufen 10^5 und 10^4 von *A. flavus* zeigten sowohl spezifische Signale auf der Sonde L772__AflavG_Lä_ITS als auch unspezifische Signale auf der Sonde L776__Asp_fumi_Lä_ITS für die Spezies *Aspergillus fumigatus*. Geringe DNA-Mengen zeigten keine Signale auf dem Array. Hybridisierungen der zweiten PCR-Produkte führten zu Signalen sofern DNA-Template-Mengen von mindestens einem Molekül eingesetzt wurden. Spezifische Signale waren auf der Sonde L773__AflavG_Lä_ITS_rc festzustellen. Zudem konnten unspezifische Signale auf der Sonde L777__Asp_fumi_Lä_ITS_rc für die Spezies *Aspergillus fumigatus* ermittelt werden. Im Gegensatz zu den Signalintensitäten, die bei 10 Molekülen ermittelt wurden, handelt es sich bei den Intensitäten, die bei lediglich einem Molekül festgestellt wurden, um weniger als die Hälfte des Wertes. Zudem waren bei der Verdünnungsstufe 10^2 weitere Unspezifitäten festzustellen: die Sonden L957__Trsp_cutag_Lä_ITS_rc und L961__Trspo_mucG2_ITS_rc zeigten Signale von etwa 2000 a.u. Die Werte der Standardabweichungen entsprachen dabei exakt den Intensitätswerten der gemittelten Sondersignale. (vgl. Abbildung 24, Tabelle 58 im Anhang). Demnach zeigte nur eines der

Replikate Signalintensitäten über dem Detektionsschwellenwert bei 1.000 a.u., wohingegen das andere Replikat ein falsch-negatives Signal aufwies.

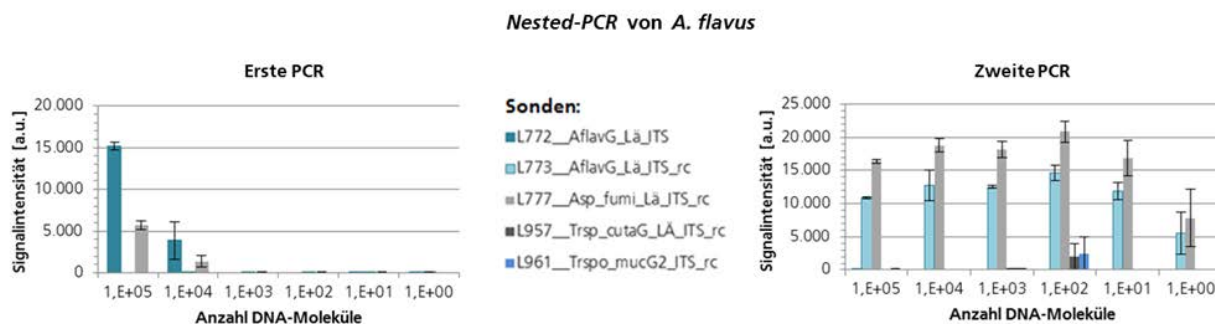


Abbildung 24: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *A. flavus*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$), die durch Hybridisierung der PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen (erste PCR) bzw. der zugehörigen PCR-Produkte der ersten PCR als Template (zweite PCR) ermittelt werden konnten.

Wurden die PCR-Produkte der ersten PCR von *A. fumigatus* hybridisiert, erhielt man lediglich für die höchste DNA-Menge von 10^5 Molekülen ein Signal auf der spezifischen Sonde L776__Asp_fumi_Lä ITS von 2.304 a.u. Es waren keine Unspezifitäten festzustellen. Nach Hybridisierung der kleineren PCR-Produkte der zweiten PCR waren bei allen Verdünnungsstufen Signale auf der spezifischen – diesmal der Antisense-Sonde L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc - zu verzeichnen. Selbst bei nur einem Molekül konnten Signale von 3.585 a.u. ermittelt werden. Unspezifische Signale traten bei einzelnen Verdünnungsstufen auf: bei 10^2 Molekülen waren Signale unter 2.000 a.u. auf den Sonden L739__C_glab ITS_rc und L841__CocGenus2 ITS_rc sowie bei einem Molekül auf der Sonde G986__Can_albi ITS_rc mit 3.746 a.u. zu verzeichnen. Die Standardabweichung des unspezifischen Signals auf der Sonde L841__CocGenus2 ITS_rc entsprach in etwa der Hälfte der Signalintensität. Die Werte der Standardabweichung der beiden anderen unspezifischen Signale wiesen nahezu identische Werte auf (vgl. Abbildung 25 und Tabelle 60 im Anhang).

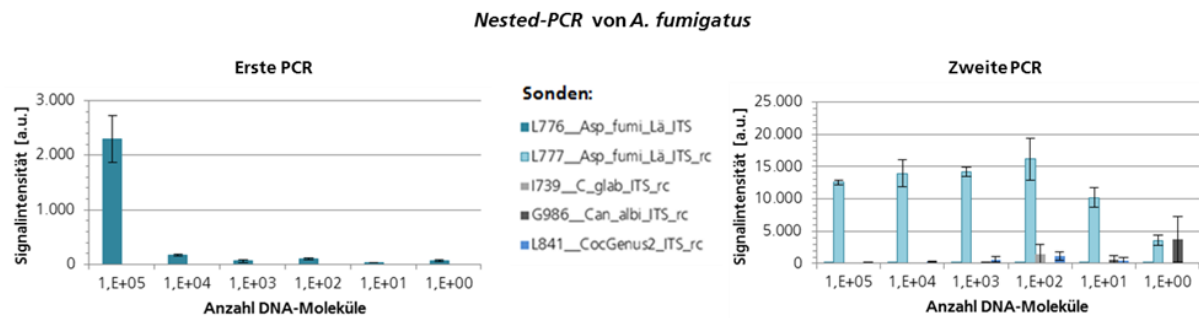


Abbildung 25: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *A. fumigatus*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$), die durch Hybridisierung der PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen (erste PCR) bzw. der zugehörigen PCR-Produkte der ersten PCR als Template (zweite PCR) ermittelt werden konnten.

Signale der ersten PCR für *Candida albicans* waren nur für 10^5 und 10^4 DNA-Moleküle festzustellen. Dabei lagen die Intensitäten der spezifischen Sense-Sonde G985__Can_albi ITS bei 7.582 a.u. für 10^5 Moleküle und 1.589 a.u. für 10^4 Moleküle. Es waren keine Unspezifitäten festzustellen. Die zweite PCR zeigte eine deutliche Zunahme der Sensitivität: selbst bei einem Molekül waren Signalintensitäten von 6.588 a.u. mit einer geringen Standardabweichung von 574 a.u. messbar. Die Fluoreszenz kam in diesem Fall auf der Antisense-Sonde G986__Can_albi ITS_rc. Es konnte ein unspezifisches Signal mit einer gemittelten Intensität von 1.043 a.u. auf der Sonde für *Trichosporon mucoides* L961__Trspo_mucG2 ITS_rc festgestellt werden. Dies trat lediglich bei 100 DNA-Molekülen auf und zeigte zudem einen sehr hohen Wert der Standardabweichung. Lediglich eines der beiden Replikate zeigte dabei Signalintensitäten über dem Detektionsschwellenwert bei 1.000 a.u., das andere Replikat wies ein falsch-negatives Signal auf. Zwei weitere unspezifische Signale konnten bei Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Replikate festgestellt werden: auf den Sonden L946__Tphy_tonsG ITS und L957__Trsp_cutag_LÄ ITS_rc, ebenfalls bei 100 Molekülen. Einer der Replikatswerte überstieg jeweils knapp den Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. Der andere lag unter dem Schwellenwert, sodass der Mittelwert der Duplikate ebenfalls darunter blieb (vgl. Abbildung 26 und Tabelle 61 im Anhang).

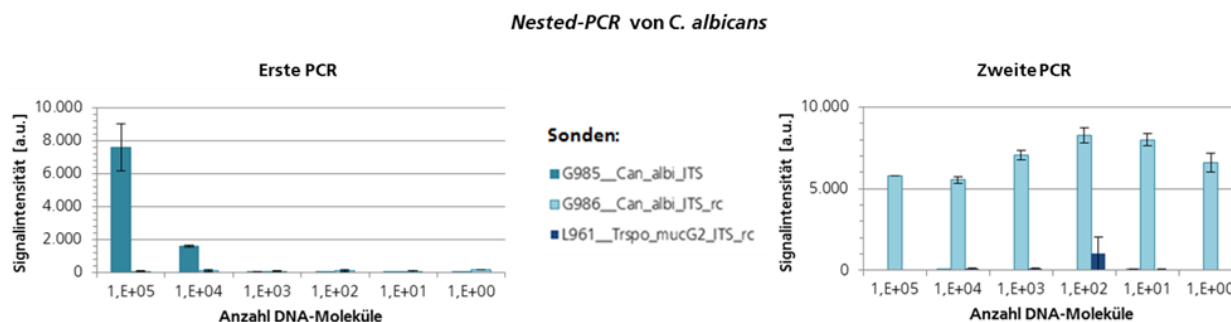


Abbildung 26: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *C. albicans*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$), die durch Hybridisierung der PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen (erste PCR) bzw. der zugehörigen PCR-Produkte der ersten PCR als Template (zweite PCR) ermittelt werden konnten.

Die erste PCR mit DNA von *Candida glabrata* zeigte auf dem Mikroarray bei keiner Verdünnungsstufe Signale über 1.000 a.u. Die zweite PCR zeigte bis zu 10 Molekülen verlässliche Signale von mindestens 10.000 a.u. auf der Antisense-Sonde I739__C_glab ITS_rc. Es konnten zudem keine unspezifischen Signale ermittelt werden (vgl. Abbildung 27 und Tabelle 62 im Anhang).

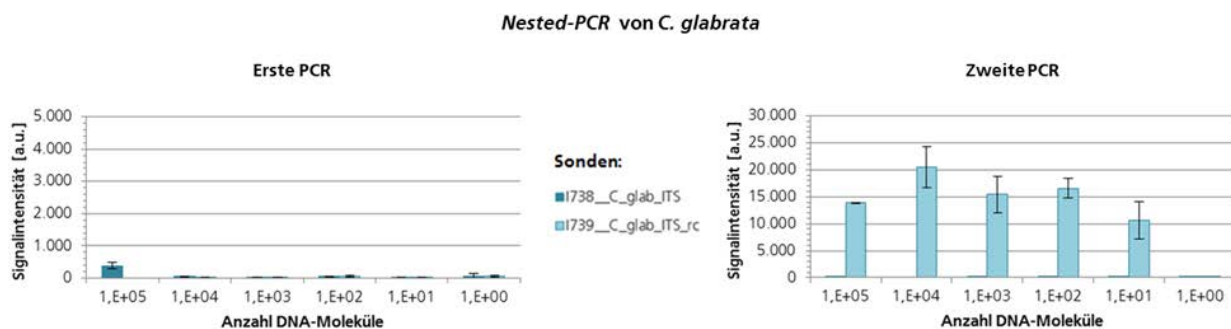


Abbildung 27: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der ersten PCR der *Nested-PCR* von *C. glabrata*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$), die durch Hybridisierung der PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen (erste PCR) bzw. der zugehörigen PCR-Produkte der ersten PCR als Template (zweite PCR) ermittelt werden konnten.

5.7 Evaluierung des PCR-Array-Systems mit DNA von Referenzstämmen

Für die Untersuchung der 96 Sonden des finalen Mikroarrays wurden je 3 ng DNA der Referenzspezies als Template für die *Nested-PCR* (vgl. 4.2.7.4) eingesetzt. Anhand der Sensitivitätsreihe konnte gezeigt werden, dass die *Nested-PCR* mit mindestens 3 ng DNA - qualitativ betrachtet - maximale Produktmengen aufwies. Dies verdeutlichten die Amplifikationsprodukte auf dem Agarosegel: bei 3 ng oder mehr DNA waren die stärksten Banden zu erkennen. Bei geringeren DNA-Mengen war dies nicht für alle untersuchten Spezies der Fall (vgl. Abbildung 23). Durch Verwendung von 3 ng DNA konnten PCR-Produkte hybridisiert werden, die unter optimalen Bedingungen produziert wurden, um u.a. die Spezifität der Sonden zu untersuchen. Um sich einer klinischen Situation anzunähern, wurden je Probe 100 ng humane HeLa-DNA eingesetzt. Es wurden jeweils technische Duplikate generiert. Die Signalintensitäten der Replikate wurden gemittelt und die Standardabweichung dieser berechnet.

Für die Spezies *Pneumocystis jirevecii* lag keine genomische DNA vor. Da diese Spezies in Laboren kaum bis nicht kultiviert werden kann und nicht ausreichend Probenmaterial vorlag, um ggf. DNA isolieren zu können, wurde die ITS-Region synthetisch hergestellt (vgl. 4.2.6) und 3 ng des PCR-Produktes als Template eingesetzt.

Die Spezies *Coccidioides immitis* und *Coccidioides posadasii* werden in die Sicherheitsstufe L3 eingestuft. Sie sind sehr nah verwandt und schwer zu differenzieren. Selbst Sequenzierungen der vorliegenden DNA dieser Spezies lieferten kein eindeutiges Ergebnis. Demnach war *Coccidioides immitis/posadasii* mit dem vorliegenden Probenmaterial nicht differenzierbar, sodass nicht 56 sondern 55 Spezies hybridisiert wurden. Die entwickelten Sonden für *Coccidioides immitis/posadasii* decken beide Spezies ab, d.h. die Sondensequenz ist in beiden Spezies vorhanden und führt bei der Hybridisierung der *Coccidioides immitis/posadasii*-DNA zu Signalen. Eine Differenzierung der beiden Spezies ist mit dieser Sonde nicht möglich. Es wurden zwölf weitere Sonden entwickelt, die nicht nur für eine Spezies spezifisch sind, sondern eine weitere nahverwandte Spezies abdecken. Für *Cryptococcus* spp. konnte nur eine Sonde entwickelt werden, die auf alle drei relevanten Spezies anspricht (vgl. Abbildung 28).

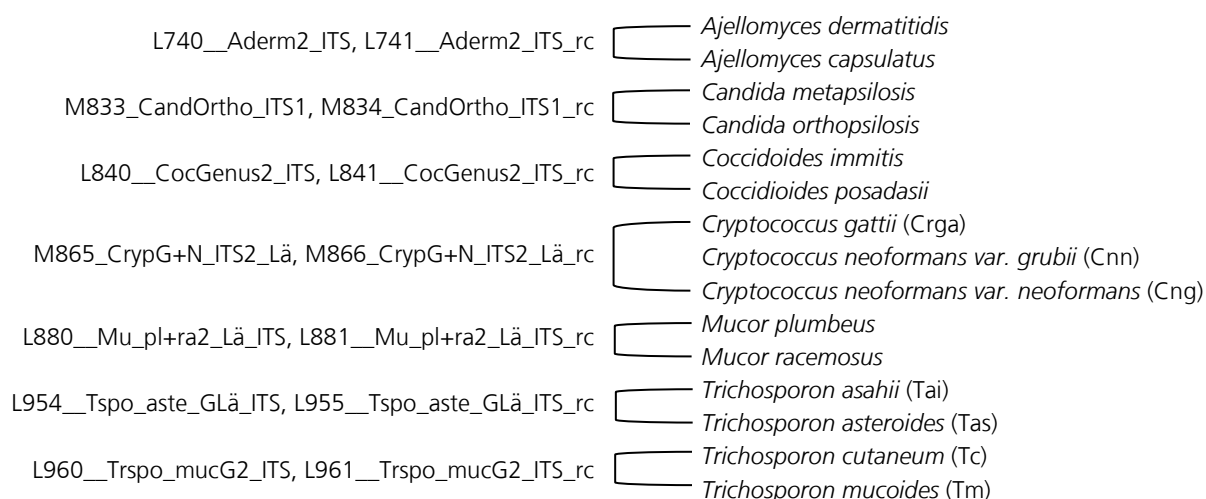


Abbildung 28: Sonden des finalen Mikroarrays, die mehr als eine Spezies abdecken. Links: Sondennamen. Rechts: Spezies, die anhand der aufgeführten Sonden abgedeckt werden.

Die *Nested-PCR* wurde nach dem Standard-Protokoll (vgl. 4.2.7.4) durchgeführt. Je nach Lage der Sonde wurde in der zweiten PCR entweder der Spacer ITS1 mit dem Primerpaar ITS 1+2 oder der Spacer ITS2 mit dem Primerpaar ITS 3+4 amplifiziert (vgl. Tabelle 50 im Anhang). Die Hybridisierungen der entstandenen Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte der zweiten PCR wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt (vgl. 4.2.12). Sofern Sense- oder Antisense-Sonden Intensitäten über 1.000 a.u. zeigten, wurde die Sonde mit der höheren Intensität gezeigt.

Unter spezifischen Signalen versteht man Signale von Sonden, die für eine bestimmte Spezies entwickelt wurden und auch bei der Hybridisierung von PCR-Produkten dieser Spezies Intensitäten über 1.000 a.u. aufweisen. Von unspezifischen Signalen spricht man, wenn Signale auf Sonden ermittelt werden konnten, die nicht für die hybridisierte Spezies entwickelt wurden aber dennoch Signale aufwiesen. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt und die ermittelten Intensitätswerte gemittelt. Von insgesamt 55 hybridisierten Spezies zeigten die Hybridisierungen der PCR-Produkte von 25 Spezies ausschließlich spezifische Signale auf den zugehörigen Sonden. Zehn Spezies zeigten zwar spezifische Signale auf den für die Spezies entwickelten Sonden, jedoch waren auf diesen Sonden auch (unspezifische) Signale bei Hybridisierungen von PCR-Produkten anderer Spezies festzustellen. Bei den verbleibenden 20 Spezies waren neben spezifischen Signalen zusätzlich unspezifische Signale auf mindestens einer weiteren Sonde festzustellen (vgl. Abbildung 29).

Abbildung 29: Spezifitätsmatrix der 55 hybridisierten Spezies und Sonden des finalen Mikroarrays. Links: Spezies, deren PCR-Produkt hybridisiert wurde, oben: Sonden, die Signale über 1.000 a.u. auf dem Mikroarray lieferten. Je nach Auftreten der Signale auf der Sense- oder Antisense-Sonden sind nur die relevanten Sonden mit Intensitäten über 1.000 a.u. gelistet. Die gemittelten Signale der Duplikate sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt: Je höher die Intensität, desto dunkler der Grauton. Die Diagonale stellt die Signale der Spezies auf den spezifischen Sonden dar. Unspezifische Signale befinden sich außerhalb der Diagonalen.

5.7.1 Spezifische Sondensignale

Die Hybridisierung der PCR-Produkte von 25 Spezies führte ausschließlich zu spezifischen Signalen auf dem Array. Dabei handelte es sich um 21 Antisense-Sonden, auf denen Signale festzustellen waren. Drei dieser Sonden erkennen mehr als eine Spezies: M866_CrypG+N_ITS2_Lä_rc, L955_Tspo_aste_GLä_ITS_rc, L961_Trspo_mucG2_ITS_rc. Weitere drei Sonden zeigten Signale unter 10.000 a.u.: G986_Can_albi_ITS_rc mit 6.297 a.u., M884_Fus_sol_2_NoLä_ITS_rc mit 8.544 a.u. und M914_PsallBoy_ITS4_rc mit 2.029 a.u.

Sonden, die bei einer Template-DNA-Menge von 3 ng niedrige Intensitätswerte aufzeigen, könnten bei noch geringeren Template-DNA-Mengen, wie es in Patientenproben der Fall sein kann, Intensitäten unterhalb des Detektionsschwellenwerts von 1.000 a.u. aufweisen. Dies würde zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Für eine zuverlässige Identifizierung der Spezies selbst - bei sehr niedrigen DNA-Mengen - sind hohe Signalintensitätswerte bei 3 ng Template-DNA-Menge erforderlich. Vier Sonden zeigten hohe Signalintensitäten über 50.000 a.u. und lagen somit nahe an der Sättigungsgrenze (vgl. Abbildung 30). 18 weiteren Sonden zeigten Signalintensitäten über 10.000 a.u. auf. Bei diesen Sonden ist die Wahrscheinlichkeit, bei niedrigeren Template-DNA-Mengen unterhalb des Detektionsschwellenwerts von 1.000 a.u. zu liegen, geringer.

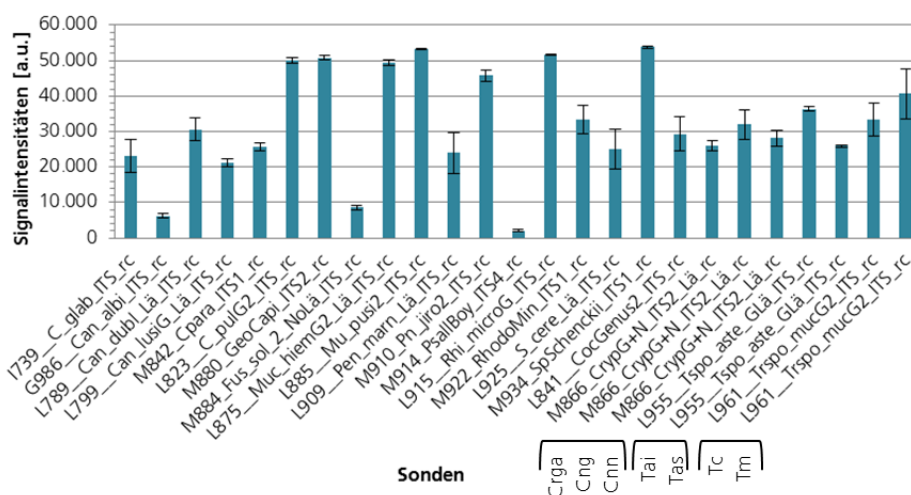


Abbildung 30: Spezifische SONDENSIGNALE, die nach Hybridisierung von Referenz-DNA auf dem DNA-Mikroarray ermittelt werden konnten. Aufgetragen sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate und zugehörige Standardabweichungen ($n=2$). Sonden, die mehrere Spezies erkennen, sind umrandet. Die jeweiligen hybridisierte Spezies sind mit Abkürzungen erwähnt: *Cryptococcus gattii* (Crga), *Cryptococcus neoformans var. grubii* (Cng), *Cryptococcus neoformans var. neoformans* (Cnn), *Trichosporon asahii* (Tai), *Trichosporon asteroides* (Tas), *Trichosporon cutaneum* (Tc) und *Trichosporon mucoides* (Tm).

Zehn Spezies zeigten spezifische Signale auf den zugehörigen neun Sonden, wenn das zugehörige PCR-Produkt hybridisiert wurde (vgl. Abbildung 31). Auf denselben neun Sonden traten jedoch auch Signale auf, wenn DNA anderer Spezies wurde. Aus diesem Grund werden diese Sonden im nächsten Unterkapitel näher betrachtet (vgl. 5.7.2).

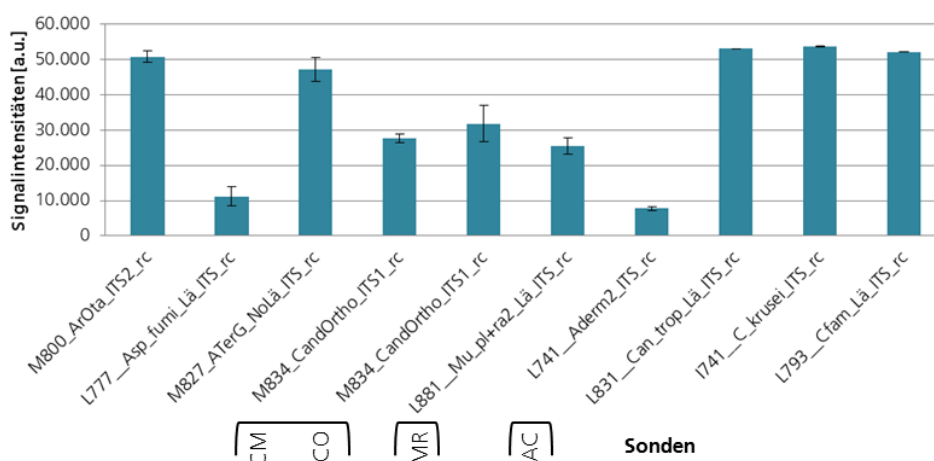


Abbildung 31: Intensitäten spezifischer Signale von Sonden, die als unspezifisches Signal bei der Hybridisierung von Referenz-DNA auf dem Mikroarray auftraten. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitätswerte der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$). Die jeweiligen hybridisierte Spezies sind mit Abkürzungen erwähnt: *Candida metapsilosis* (CM), *Candida orthopsilosis* (CO), *Mucor racemosus* (MR), *Ajellomyces capsulatus* (AC).

5.7.2 Sonden mit Kreuzreaktivitäten

Bei zehn von zwanzig Spezies waren nach der Hybridisierung der PCR-Produkte ausschließlich spezifische Signale auf Sonden für die jeweiligen Spezies festzustellen (vgl. Abbildung 31), allerdings waren auch Signale auf diesen Sonden bei der Hybridisierung anderer Spezies zu ermitteln. Die Sonde für *Aspergillus fumigatus* L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc stellt ein repräsentatives Beispiel für eine Kreuzreaktivität dar: Wurden PCR-Produkte von *A. fumigatus* hybridisiert, waren ausschließlich Signale auf der zugehörigen Sonde festzustellen, wohingegen die Hybridisierung der nahverwandten Spezies *A. niger* und *A. flavus* neben spezifischen Signalen zudem zu Kreuzreaktivitäten u.a. auf der Sonde für *A. fumigatus* zeigten (vgl. Abbildung 31 und Tabelle 29).

Bei der Hybridisierung der PCR-Produkte von 20 weiteren Spezies traten neben spezifischen Signalen zusätzlich unspezifische Signale auf Sonden für andere Spezies auf. Die spezifischen Sonden signale zeigten bis auf fünf Ausnahmen Signalintensitäten über 10.000 a.u. Bei diesen hohen Intensitätswerten ist die Wahrscheinlichkeit bei niedrigeren DNA-Mengen unter dem Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. zu liegen, gering. Intensitätswerte unter 10.000 a.u. konnten bei den Sonden für *Aspergillus flavus* L773__AflavG_Lä ITS_rc, *Aspergillus niger* L781__AnigG_Lä ITS_rc und *Malassezia furfur* M892_Mal_furf_NoLä ITS_rc festgestellt werden (vgl. Abbildung 32). Bei diesen Spezies ist die Wahrscheinlichkeit falsch-negativer Ergebnisse aufgrund der Unterschreitung des Detektionsschwellenwerts von 1.000 a.u. durch geringe Template-DNA-Mengen höher.

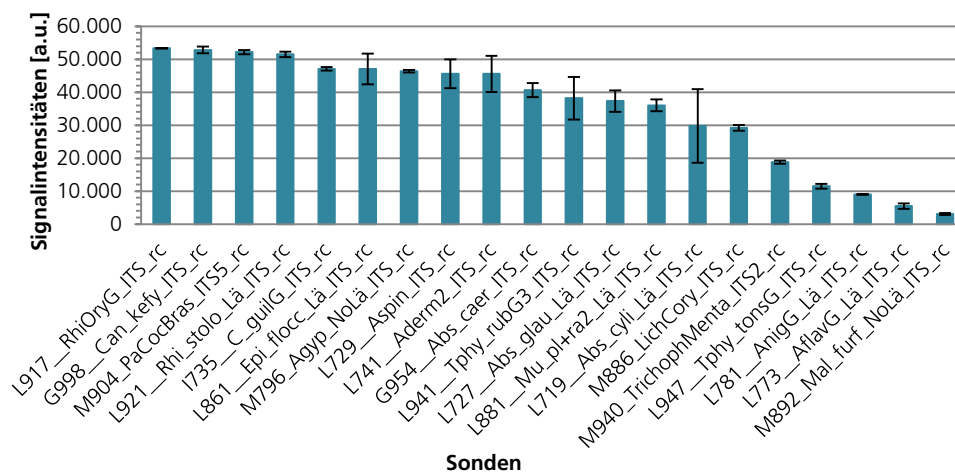


Abbildung 32: Spezifische Signale der Sonden mit Kreuzreaktivitäten, die nach Hybridisierung von Referenz-DNA auf dem DNA-Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die gemittelten Werte der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung (n=2).

Konnten Signale auf Sonden festgestellt werden, die für andere Spezies entwickelt wurden, handelt es sich um unspezifische Signale, sogenannte Kreuzreaktivitäten. 63 % der unspezifischen SONDENSIGNALE zeigten Intensitätswerte unter 5.000 a.u., davon unterschritten sieben Signale einen Intensitätswert von 2.000 a.u. und lagen damit nahe am Detektionsschwellenwert, der bei 1.000 a.u. festgelegt wurde. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese unspezifischen Signale bei geringeren Template-DNA-Mengen unterhalb des Schwellenwertes liegen, ist damit sehr hoch. Wäre dies der Fall, würden die Kreuzreaktivitäten nicht zu falsch-positiven Signalen führen.

Lediglich fünf unspezifische SONDENSIGNALE wiesen hohe Intensitätswerte über 10.000 a.u. (vgl. Abbildung 33). Selbst bei geringeren Template-DNA-Mengen wäre eine Unterschreitung des Detektionsschwellenwertes von 1.000 a.u. und einem daraus resultierenden falsch-positiven Signal eher unwahrscheinlich. Bei diesen Spezies handelt es sich um *Absidia spinosa*, *Candida krusei* und *Trichopyhton rubrum*, die als falsch-positives Signal bei der Hybridisierung nahverwandter Spezies auftraten. Bei monomikrobiellen Infektionen würde allerdings die Möglichkeit einer *Zwei-Sonden-Diskriminierung* bestehen, die eine eindeutige Identifizierung der Spezies erlauben würde (vgl. 6.3.4).

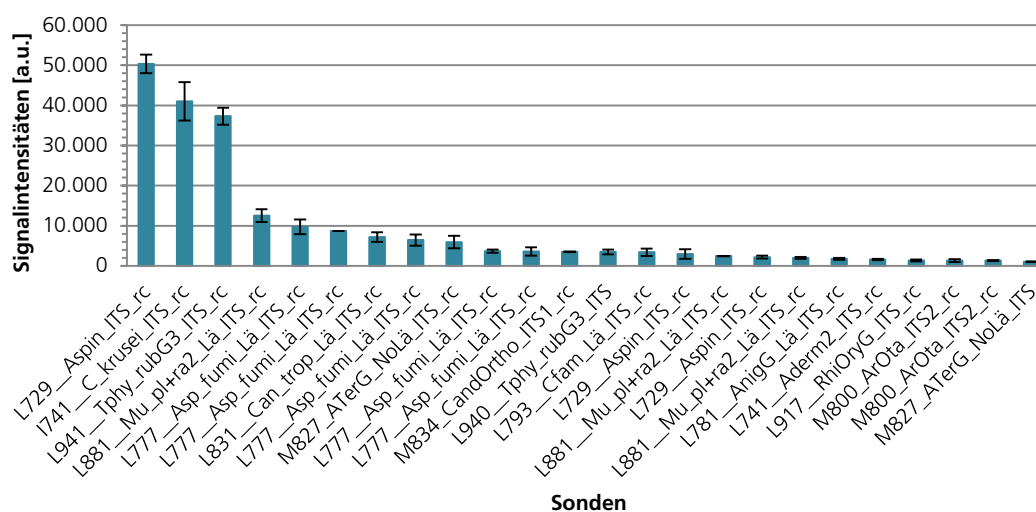


Abbildung 33: Intensitäten unspezifischer Signale, die bei der Hybridisierung von Referenz-DNA auf dem Mikroarray auftraten. Gezeigt sind die gemittelten Werte der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung (n=2).

Zum Vergleich der Intensitäten der spezifischen und unspezifischen Signale, die bei der Hybridisierung von *Nested-PCR*-Produkten der 20 Spezies ermittelt werden konnten, wurden die Signalintensitäten der Hybridisierungsergebnisse nebeneinander aufgetragen (vgl. Abbildung 34). Bei 15 von 20 Einzelspezies-Hybridisierungen machten die Intensitätswerte der unspezifischen Signale weniger als 20 % der spezifischen Signalintensitätswerte aus. Bei lediglich fünf Einzelspezies-Hybridisierungen waren Signalintensitäten der unspezifischen Signale festzustellen, deren Werte mehr als 20 % des Intensitätswerts des spezifischen Signals ausmachten.

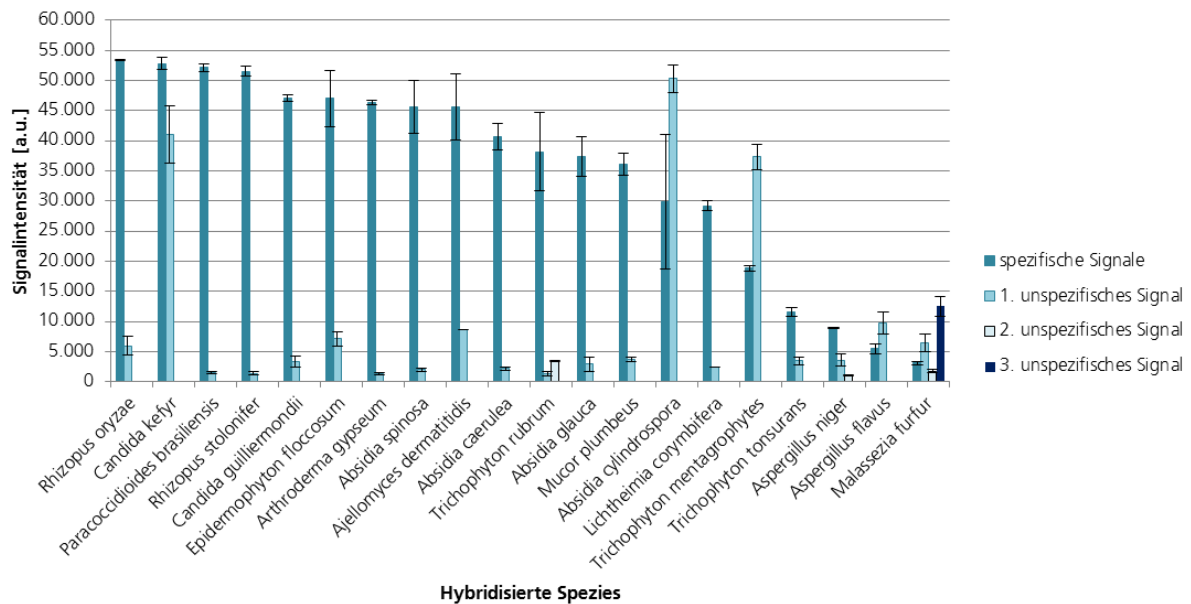


Abbildung 34: Intensitätsverhältnis von spezifischen zu unspezifischen Signalen bei der Einzelspezies-Hybridisierung von 3 ng Referenz-DNA. 20 Spezies zeigten neben spezifischen Signalen auch unspezifische Signale auf Sonden, die für andere Spezies als die hybridisierte Spezies entwickelt wurden. Gezeigt sind die gemittelten Werte der Duplikate der spezifischen und unspezifischen Signale und die zugehörige Standardabweichung (n=2).

5.7.2.1 *Absidia* und *Lichtheimia* Spezies

Sowohl spezifische als auch unspezifische Signale traten bei Hybridisierungen von *Absidia* spp. bzw. *Lichtheimia* spp. auf. *A. caerulea*, *A. cylindrospora* und *A. glauca* zeigten neben hohen spezifischen Signalen auf Antisense-Sonden von über 29.000 a.u. zudem Signale auf der Antisense-Sonde für eine andere *Absidia* Spezies *A. spinosa* L729__Aspin_ITS_rc. Während das unspezifische Signal bei *A. cylindrospora* mit knapp 50.000 a.u. sehr hoch ist, zeigten die Werte der anderen beiden *Absidia* spp. geringere Intensitäten von ca. 2.000 a.u. bis 3.000 a.u. Da diese Signalintensitäten nahe des Detektionsschwellenwerts liegen, könnte es sein, dass bei der Hybridisierung geringerer DNA-Template-Mengen keine falsch-positiven Signale festzustellen wären. Wurde das PCR-Produkt für *A. spinosa* selbst hybridisiert, waren spezifische SONDENSIGNALE mit einer Intensitäten von mindestens 45.000 a.u. zu verzeichnen. Zudem war ein unspezifisches Signal auf der Antisense-Sonde für die Spezies *Mucor plumbeus/racemosus* L881__Mu_pl+ra2_Lä_ITS_rc mit einer geringen Intensität von unter 2.000 a.u. festzustellen. Unspezifische Signale auf dieser Sonde traten auch bei der Hybridisierung von DNA der Spezies *Lichtheimia corymbifera* mit einer ebenso geringen Intensität von unter 2.500 a.u. auf. Auch in diesen Fällen wäre bei geringeren Template-DNA-Mengen das Ausbleiben der falsch-positiven Signale möglich. Die spezifische Antisense-Sonde M886_LichCory_ITS_rc zeigte dagegen Werte über 29.000 a.u. (vgl. Tabelle 28). *Absidia spinosa* kann somit nicht von den anderen *Absidia* spp. unterschieden werden. Bei monomikrobiellen Infektionen würde für die speziesspezifische Identifizierung die Möglichkeit der *Zwei-Sonden-Diskriminierung* bestehen (vgl. 6.3.4).

Tabelle 28: Spezifische und unspezifische Signale von *Absidia/Lichtheimia* spp. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate, die bei der Hybridisierung von Referenz-DNA auftraten. Diese sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt: Je höher die Intensität, desto dunkler der Grauton. Links sind die Spezies aufgelistet, die als Template für die PCR eingesetzt wurden. Je nach Auftreten der Signale auf der Sense- oder Antisense-Sonden sind nur die relevanten Sonden mit Intensitäten über 1.000 a.u. gelistet.

Spezies/Sonden	G954__Abs_caer ITS_rc	L719__Abs_cyli_Lä ITS_rc	L727__Abs_glau_Lä ITS_rc	L729__Aspin ITS_rc	M886_LichCory ITS_rc	L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc
<i>Absidia caerulea</i>	40650			2182		
<i>Absidia cylindrospora</i>		29799		50342		
<i>Absidia glauca</i>			37320	2935		
<i>Absidia spinosa</i>				45589		1981
<i>Lichtheimia corymbifera</i>					29209	2425

5.7.2.2 *Aspergillus* Spezies

Die *Aspergillus* Spezies *A. fumigatus* und *A. terreus* zeigten spezifische Signale auf den zugehörigen Antisense-Sonden von über 11.000 bzw. 47.000 a.u. Unspezifitäten zu Sonden anderer *Aspergillen* bzw. entfernt verwandter Spezies auf dem Mikroarray waren nicht festzustellen. Für *A. niger* und *A. flavus* konnten spezifische Signalintensitäten von mindestens 8.000 a.u. bzw. 5.000 a.u. auf den jeweiligen Antisense-Sonden ermittelt werden. Diese beiden Spezies erzeugten ebenfalls Signale auf der Sonde für *A. fumigatus* mit Intensitäten von über 3.000 a.u. bzw. 9.000 a.u. *A. fumigatus* kann mit diesem Array deshalb nicht eindeutig von *A. flavus* und *A. niger* differenziert werden. Würde es sich bei einer Patientenprobe um eine monomikrobielle Infektion handeln, könnten diese Spezies über die *Zwei-Sonden-Diskriminierung* eindeutig identifiziert werden (vgl. 6.3.4). Für *A. niger* ist zudem ein unspezifisches Signal auf der Sense-Sonde für *A. terreus* M827_ATerG_NoLä ITS mit einer Intensität von knapp über dem Schwellenwert von 1.000 a.u. zu verzeichnen (vgl. Tabelle 29). Bei geringeren DNA-Template-Mengen könnte es sein, dass bei der Hybridisierung von *A. niger* keine falsch-positiven Signale auf der Sonde M827_ATerG_NoLä ITS festzustellen wären.

Die Antisense-Sonde L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc trat ebenfalls als unspezifisches Signal bei Hybridisierungen der Spezies *Ajellomyces capsulatus* und *Mucor plumbeus* mit Intensitäten von über 8.000 a.u. bzw. 3.000 a.u. auf.

Tabelle 29: Spezifische und unspezifische Signale von *Aspergillus* spp. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate, die bei der Hybridisierung von Referenz-DNA auftraten. Diese sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt: Je höher die Intensität, desto dunkler der Grauton. Links sind die Spezies aufgelistet, die als Template für die PCR eingesetzt wurden. Je nach Auftreten der Signale auf der Sense- oder Antisense-Sonden sind nur die relevanten Sonden mit Intensitäten über 1.000 a.u. gelistet.

Spezies/Sonden	L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc	M827_ATerG_Nolä ITS_rc	M827_ATerG_Nolä ITS	L773__AflavG_Lä ITS_rc	L781__AnigG_Lä ITS_rc
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11171				
<i>Aspergillus terreus</i>		47218			
<i>Aspergillus niger</i>	3589		1031		8976
<i>Aspergillus flavus</i>	9748			5456	

5.7.2.3 *Ajellomyces* spp, *Mucor* ssp. und *Paracoccidioides brasiliensis*

A. capsulatus und *A. dermatitidis* werden von derselben Sonde abgedeckt. Sie können aufgrund hoher Sequenzhomologien innerhalb der ITS-Region nicht differenziert werden. Die spezifischen Signale sind dabei unterschiedlich hoch: kann man bei *A. capsulatus* ein Signal von über 7.000 a.u. verzeichnen, liegt die Intensität von *A. dermatitidis* mit über 45.000 a.u. deutlich höher. *Mucor plumbeus* und *M. racemosus* werden ebenfalls über eine Sonde abgedeckt. Die spezifischen Signale zeigen Intensitäten über 25.000 a.u. bzw. und 36.000 a.u. (vgl. Tabelle 30).

Das PCR-Produkt von *Paracoccidioides brasiliensis* führte zu spezifischen Signalen auf der Antisense-Sonde M904_PaCocBras ITS5_rc mit Intensitäten von über 52.000 a.u. Zudem konnte ein unspezifisches Signal ermittelt werden, das jedoch unter 2.000 a.u. liegt. Es handelte sich dabei um die Sonde für *Ajellomyces dermatitidis* L741__Aderm2 ITS_rc (vgl. Tabelle 30). Somit lag die Intensität des unspezifischen Sonden Signals knapp über dem Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese falschen positiven Signale bei niedrigeren Template-DNA-Mengen von *P. brasiliensis* unter dem Schwellenwert liegen, ist demnach hoch.

Tabelle 30: Spezifische und unspezifische Signale von *Ajellomyces* spp. *Mucor* spp. und *Paracoccidioides brasiliensis*, die jeweils über eine Sonde abgedeckt werden. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate, die bei der Hybridisierung von Referenz-DNA auftraten. Diese sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt: Die gemittelten Signale der Duplikate sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt. Die gemittelten Signale der Duplikate sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt: Je höher die Intensität, desto dunkler der Grauton. Links sind die Spezies aufgelistet, die als Template für die PCR eingesetzt wurden. Je nach Auftreten der Signale auf der Sense- oder Antisense-Sonden sind nur die relevanten Sonden mit Intensitäten über 1.000 a.u. gelistet.

Spezies/Sonden	L741__Aderm2 ITS_rc	L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc	L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc	M904_PaCocBras ITS5_rc
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	7784			
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	45569		8685	
<i>Mucor plumbeus</i>		36023	3682	
<i>Mucor racemosus</i>		25418		
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1556			52165

5.7.2.4 *Arthroderma* Spezies

Die Hybridisierung des PCR-Produktes von *Arthroderma otae* führte zu einem hohen spezifischen Signal von über 50.000 a.u. auf der Antisense-Sonde M800_ArOta ITS2_rc. Wurde das PCR-Produkt von *Arthroderma gypseum* hybridisiert, kam es zu einem hohen spezifischen Signal über 46.000 a.u. und einer sehr geringen unspezifischen Signal auf der Antisense-Sonde von *A. otae* (vgl. Tabelle 31). Bei geringeren DNA-Template-Mengen könnte es sein, dass bei der Hybridisierung von *A. gypseum* keine falsch-positiven Signale festzustellen wären, sofern die Intensität der unspezifischen Signale unter dem Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. liegen würde.

Tabelle 31: Spezifische und unspezifische Signale von *Arthroderma* spp. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate, die bei der Hybridisierung von Referenz-DNA auftraten. Diese sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt: Je höher die Intensität, desto dunkler der Grauton. Links sind die Spezies aufgelistet, die als Template für die PCR eingesetzt wurden. Je nach Auftreten der Signale auf der Sense- oder Antisense-Sonden sind nur die relevanten Sonden mit Intensitäten über 1.000 a.u. gelistet.

Spezies/Sonden	M800_ArOta ITS2_rc	M796_Agyp_NoLä ITS_rc
<i>Arthroderma otae</i>	50856	
<i>Arthroderma gypseum</i>	1318	46357

5.7.2.5 *Candida* Spezies, *Epidermophyton floccosum* und *Rhizopus* Spezies

Konnten für die Spezies *Candida famata* lediglich spezifische Signale auf der Antisense-Sonde von mindestens 52.000 a.u. beobachtet werden, ließen sich für *C. guilliermondii* neben einem hohen gemittelten Signal von über 47.000 a.u. auf der Antisense-Sonde zudem unspezifische Signale auf der *C. famata*-Sonde feststellen. Diese sind mit unter 4.000 a.u. geringer als die spezifischen Signalintensitäten. Ähnlich verhält es sich mit den Spezies *C. kefyr* und *C. krusei*: Beide Spezies zeigten hohe spezifische Signale auf den jeweiligen Antisense-Sonden. Das unspezifische Signal bei Hybridisierung von *C. kefyr*-PCR-Produkten ist mit knapp 41.000 a.u. auf der *C. krusei*-Antisense-Sonde sehr hoch. Würde es sich um monomikrobielle Infektionen handeln, könnte die *Zwei-Sonden-Diskriminierung* für eine eindeutige Diskriminierung der jeweiligen *Candida* Spezies greifen (vgl. 6.3.4).

Bei den Spezies *Rhizopus oryzae* und *Rhizopus stolonifer* war wie bei *C. famata/C. guilliermondii* und *C. kefyr/C. krusei* ebenfalls zu beobachten, dass eine Sonde spezifische Signale liefert, wohingegen die andere Spezies zu Signalen auf beiden *Rhizopus*-Sonden führte. Beide speziesspezifischen Signale zeigten Intensitätswerten über 50.000 a.u. Das unspezifische Signal von *R. stolonifer* auf der Antisense-Sonde für *R. oryzae* L917__RhiOryG_ITS_rc war mit knapp über 1.000 a.u. sehr niedrig. Bei geringeren DNA-Template-Mengen könnte es sein, dass bei der Hybridisierung von *R. stolonifer* keine falsch-positiven Signale auf der Sonde L917__RhiOryG_ITS_rc festzustellen wären. *Rhizopus oryzae* zeigte zudem auf der Sonde für *Aspergillus terreus* M827_ATerG_NoLä_ITS_rc gemittelte Signalintensitäten von 5.921 a.u.

Candida metapsilosis und *Candida orthopsilosis* wurden beide aufgrund von Sequenzhomologien durch eine gemeinsame Sonde abgedeckt, die keine Diskriminierung dieser Spezies liefert. Beide Spezies zeigten Signale auf der Antisense-Sonde M834_CandOrtho_ITS1_rc mit Intensitäten von 27.608 a.u. bzw. 31.843 a.u. Unspezifitäten waren keine festzustellen. Die Hybridisierung des PCR-Produktes von *C. tropicalis* führte zu einem spezifischen Signal auf der Antisense-Sonde L831__Can_trop_Lä_ITS_rc von über 50.000 a.u. Zudem konnte kein unspezifisches Signal ermittelt werden. Allerdings zeigte sich die Sonde ebenfalls als unspezifisches Signal bei der Hybridisierung des PCR-Produktes von *Epidermophyton floccosum* mit einer Intensität von 7.158 a.u. Die *E. floccosum*-spezifische Sonde L861__Epi_flocc_Lä_ITS_rc zeigte dabei Signale von 47.044 a.u. (vgl. Tabelle 32). Auch in diesem Fall wäre bei monomikrobiellen Infektionen eine *Zwei-Sonden-Diskriminierung* zur speziesspezifischen Identifizierung möglich (vgl. 6.3.4).

Tabelle 32: Spezifische und unspezifische Signale von *Candida* spp. und *Epidermophyton floccosum* und *Rhizopus* spp. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate, die bei der Hybridisierung von Referenz-DNA auftraten. Diese sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt: Je höher die Intensität, desto dunkler der Grauton. Links sind die Spezies aufgelistet, die als Template für die PCR eingesetzt wurden. Je nach Auftreten der Signale auf der Sense- oder Antisense-Sonden sind nur die relevanten Sonden mit Intensitäten über 1.000 a.u. gelistet.

Spezies/Sonden	L793__Cfam_Lä ITS_rc	I735__C_guillG ITS_rc	G998__Can_kefy ITS_rc	I741__C_krusei ITS_rc	M834_CandOrtho ITS1_rc	L831__Can_trop_Lä ITS_rc	L861__Epi_flocc_Lä ITS_rc	L917__RhiOryG ITS_rc	L921__Rhi_stolo_Lä ITS_rc	M827_ATerG_NoLä ITS_rc
<i>Candida famata</i>	52234									
<i>Candida guilliermondii</i>	3391	47093								
<i>Candida kefy</i>			52832	41026						
<i>Candida krusei</i>				53737						
<i>Candida metapsilosis</i>					27608					
<i>Candida orthopsilosis</i>					31843					
<i>Candida tropicalis</i>						53086				
<i>Epidermophyton floccosum</i>						7158	47044			
<i>Rhizopus oryzae</i>								53361		5921
<i>Rhizopus stolonifer</i>								1358	51502	

5.7.2.6 *Trichophyton* Spezies

Durch Hybridisierung der PCR-Produkte der drei *Trichophyton* Spezies wurden spezifische Signale auf den jeweiligen Antisense-Sonden sowie unspezifische Signale auch auf einer Sense-Sonde beobachtet. Für *T. mentagrophytes* konnten spezifische Signale auf der Sonde M940_TrichophMenta ITS2_rc von über 18.000 a.u. und unspezifische Signale auf der Sonde L941__Tphy_rubG3 ITS_rc für *T. rubrum* mit Signalintensitäten von über 37.000 a.u. festgestellt werden. Demnach zeigt das unspezifische Signal höhere Intensitätswerte. Diese Spezies wären in einer monomikrobiellen Probe nur über eine *Zwei-Sonden-Diskriminierung* zu differenzieren (vgl. 6.3.4).

Bei den anderen *Trichophyton* Spezies zeigten die unspezifischen Signale geringere Intensitätswerte als die spezifischen Signale der Antisense-Sonden: L941__Tphy_rubG3 ITS_rc zeigte spezifische Signale für *T. rubrum* mit einer gemittelten Intensität von über 38.000 a.u. Unspezifische Signale von 1.330 a.u. und 3.472 a.u. waren auf den Antisense-Sonden für *Arthroderma otae* M800_ArOta ITS2_rc bzw. *Candida metapsilosis/orthopsilosis* M834_CandOrtho ITS1_rc zu verzeichnen. Die *Trichophyton tonsurans*-spezifische Antisense-Sonde L947__Tphy_tonsG ITS_rc zeigte Intensitätswerte von über 11.000 a.u. und ein unspezifisches Signal - diesmal auf einer Sense-Sonde: L940__Tphy_rubG3 ITS leuchtete mit einer Intensität von 3.468 a.u. (vgl. Tabelle 33). Je näher sich die unspezifischen Signalintensitäten bei 3 ng Template-DNA-Menge am Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. befinden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Intensitäten bei niedrigeren Template-DNA-Mengen unterhalb des Schwellenwertes liegen. Somit wären keine falsch-positiven Signale festzustellen.

Tabelle 33: Spezifische und unspezifische Signale von *Trichophyton* spp. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate, die bei der Hybridisierung von Referenz-DNA auftraten. Diese sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt: Je höher die Intensität, desto dunkler der Grauton. Links sind die Spezies aufgelistet, die als Template für die PCR eingesetzt wurden. Je nach Auftreten der Signale auf der Sense- oder Antisense-Sonden sind nur die relevanten Sonden mit Intensitäten über 1.000 a.u. gelistet.

Spezies/Sonden	M940_TrichophMenta ITS2_rc	L947_Tphy_tonsG ITS_rc	L941_Tphy_rubG3 ITS_rc	L940_Tphy_rubG3 ITS	M800_ArOta ITS2_rc	M834_CandOrtho ITS1_rc
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	18802		37332			
<i>Trichophyton tonsurans</i>		11499		3468		
<i>Trichophyton rubrum</i>			38193		1330	3472

5.7.2.7 Sonden mit mehr als zwei Kreuzreaktivitäten: *Malassezia furfur*

Für die hybridisierte Spezies *Malassezia furfur* konnten neben dem spezifischen Signal mehr als zwei unspezifische Signale festgestellt werden. Das spezifische Signal nach Hybridisierung des PCR-Produktes von *M. furfur* zeigte auf der Antisense-Sonde M892_Mal_furf_NoLä ITS_rc nur geringe Intensitätswerte von 3.076 a.u. Die unspezifischen Signale zeigten – abgesehen von der Antisense-Sonde für *Aspergillus niger* L781__AnigG_Lä ITS_rc mit einer Intensität von nur 1.742 a.u. – höhere Intensitätswerte als die spezifische *M. furfur*-Sonde. Die Signalintensität der Sonde für *Aspergillus fumigatus* L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc zeigte mit 6.434 a.u. mindestens doppelte so hohe Werte. Die Intensität des Signals der Antisense-Sonde L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc für die Spezies *Mucor plumbeus/racemosus* war sogar mindestens viermal so hoch. Diese Sonde trat ebenfalls als unspezifisches Signal bei der Hybridisierung der Spezies *Absidia spinosa* und *Lichtheimia corymbifera* auf (vgl. Tabelle 28). Demnach ist die Diskriminierungskraft der Sonden für *A. fumigatus*, *A. niger* und *Mucor plumbeus/racemosus* aus Sequenzhomologiegründen nicht hoch genug, um sie von *Malassezia furfur* eindeutig trennen zu können.

Die Antisense-Sonde für *Aspergillus fumigatus* L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc war neben *M. furfur* ebenfalls unspezifisches Signal bei der Hybridisierung folgender Spezies: *Ajellomyces dermatitidis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* und *Mucor plumbeus*. Die Sondensequenz identifiziert *Aspergillus fumigatus* eindeutig, sofern das PCR-Produkt dieser Spezies hybridisiert wird (vgl. Tabelle 29). Allerdings ist die Diskriminierungskraft der Sonde zu den genannten unzureichend. Eine eindeutige Identifizierung dieser Spezies ist demnach nicht möglich, kann jedoch bei monomikrobiellen Infektionen durch eine *Zwei-Sonden-Diskriminierung* ermöglicht werden (vgl. 6.3.4).

Tabelle 34: Spezies mit mehr als zwei unspezifischen Signalen. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate, die bei der Hybridisierung von Referenz-DNA auftraten. Diese sind in Graustufen hinsichtlich ihrer Intensitäten unterlegt: Je höher die Intensität, desto dunkler der Grauton. Links sind die Spezies aufgelistet, die als Template für die PCR eingesetzt wurden. Je nach Auftreten der Signale auf der Sense- oder Antisense-Sonden sind nur die relevanten Sonden mit Intensitäten über 1.000 a.u. gelistet.

Spezies/Sonden	M892_Mal_furf_Nolä ITS_rc	M904_PaCocBras ITS5_rc	L777_Asp_fumi_Lä ITS_rc	L781_ArniG_Lä ITS_rc	L881_Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc	L741_Aderm2 ITS_rc
<i>Malassezia furfur</i>	3076		6434	1742	12509	

5.7.3 Coinfektionen

Monomikrobielle Infektionen kennzeichnen sich durch das Vorkommen eines einzigen pathogenen Erregers und sind wesentlich häufiger beschrieben als polymikrobielle Infektionen mit mehr als einem beteiligten Pathogen (Rolston *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der Evaluierung mit DNA aus Referenzspezies (vgl. 5.7) beruhen auf der Verwendung von DNA einer Spezies und repräsentieren demnach eine monomikrobielle Situation. Wie sich der Array verhält, wenn eine polymikrobielle Situation vorliegt, wurde ebenfalls untersucht und wird in diesem Kapitel behandelt.

Es wurden DNA-Verdünnungsreihen zweier Spezies hergestellt: beginnend bei 10^6 Molekülen wurde die DNA in 1:10-Verdünnungsschritten bis hin zu einem Molekül seriell verdünnt. DNA beider Spezies wurde in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander innerhalb einer Probe (vgl. Tabelle 35) mittels *Nested-PCR* und Hybridisierungen des finalen Mikroarrays untersucht. Die Coinfektionsversuche wurden dabei basierend auf einem Primärpathogen zuzüglich eines Sekundärpathogens durchgeführt. Dabei handelte es sich um *Candida albicans* als Primärpathogen und *Aspergillus fumigatus* als Sekundärpathogen. Der umgekehrte Fall mit *A. fumigatus* als Primär- und *C. albicans* als Sekundärpathogen wurde nicht berücksichtigt. Es wurden jeweils technische Duplikate generiert. Die Signalintensitäten der Replikate wurden gemittelt und die Standardabweichung dieser berechnet.

Tabelle 35: DNA-Mischungsverhältnis zweier Pathogene innerhalb einer Probe für die *Nested-PCR* der Coinfektionsversuche. In grau dargestellt ist die Anzahl der DNA-Moleküle der jeweiligen Pathogene.

Sekundärpathogen	Primärpathogen						
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10	1
10^6	1:1	1:10	1: 10^2	1: 10^3	1: 10^4	1: 10^5	1: 10^6
10^5		1:1	1:10	1: 10^2	1: 10^3	1: 10^4	1: 10^5
10^4			1:1	1:10	1: 10^2	1: 10^3	1: 10^4
10^3				1:1	1:10	1: 10^2	1: 10^3
10^2					1:1	1:10	1: 10^2
10						1:1	1:10
1							1:1

Candida albicans gilt heutzutage als das wichtigste fungale Humanpathogen; die Konidien des humanpathogenen filamentösen Pilzes *Aspergillus fumigatus* sind weltweit in der Umwelt vertreten (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Aus diesen Gründen wurden die genannten Spezies für die Coinfektionsversuche ausgewählt. Sonden für beide Spezies befinden sich in Spacer ITS2 (vgl. Tabelle 50 im Anhang). Somit wurde das Primerpaar ITS 3+4 in der zweiten PCR der *Nested-PCR* eingesetzt. Sowohl die *Nested-PCR* als auch die Hybridisierungen wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt (vgl. 4.2.7.4, 4.2.12), allerdings wurde das Pipettierprotokoll der *Nested-PCR* angepasst: Da je Spezies 1 μ l DNA eingesetzt wurde, wurde 1 μ l weniger Wasser (*Aqua moleculare*) auf 25 μ l-PCR-Ansatz verwendet. Um sich einer klinischen Situation anzunähern, wurde je Probe 100 ng humane HeLa-DNA eingesetzt. Die durch die zweite PCR der *Nested-PCR* entstandenen PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen.

Das PCR-Produkt von *C. albicans* hat eine *in silico* ermittelte Größe von 338 bp, das von *A. fumigatus* eine Größe von 353 bp. Der Größenunterschied von 20 Basenpaaren ist zu gering, um die PCR-Produkte beider Spezies als Banden auf dem Agarosegel erkennen zu können. Aus diesem Grund zeigt sich nur eine Bande zwischen 300 bp und 400 bp auf dem Gel. Zudem ist eine Bande bei ca. 500 bp zu erkennen. Die ist das PCR-Produkt der ersten PCR, das durch das Primerpaar ITS 1+4 entstand und die gesamte ITS-Region amplifiziert. Da dieses Template der zweiten PCR war, konnte das Produkt ebenfalls aufgetrennt werden.

Bei 10^6 und 10^5 DNA-Molekülen von *C. albicans* konnten bei allen Molekülzugaben von *A. fumigatus* PCR-Produkte der ersten und zweiten PCR der *Nested-PCR* auf dem Gel festgestellt werden. Ab 10^4 *C. albicans*-Molekülen nahm das PCR-Produkt der ersten PCR deutlich ab. Gleichzeitig ist eine Zunahme unspezifischer PCR-Produkte zu erkennen. Dies konnte bereits bei der Sensitivitätsstudie beobachtet werden: Unter Verwendung des Primerpaares ITS 3+4 konnte bei abnehmender spezifischer DNA-Template menge eine Zunahme unspezifischer PCR-Produkte festgestellt werden (vgl. 5.6.2). Wurde nur ein DNA-Molekül beider Spezies in die erste PCR eingesetzt, sind keine PCR-Produkte der zweiten PCR auf dem Gel sichtbar. Die Negativkontrolle der ersten PCR, die als Template in die zweite PCR eingesetzt wurde (NK1) zeigte unspezifische Produkte, wohingegen die Negativkontrolle der zweiten PCR keine Amplifikationen zeigte (vgl. Abbildung 35).

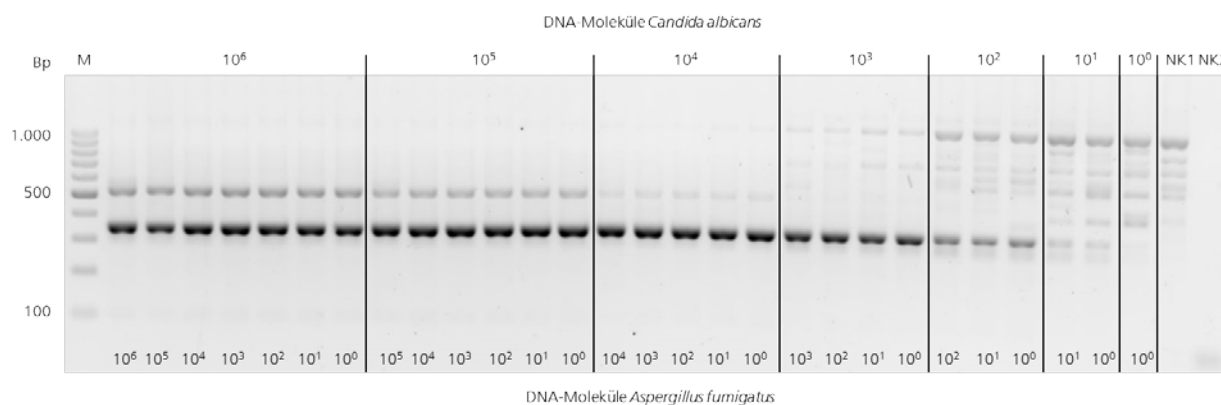


Abbildung 35: Geldokumentation der *Nested-PCR* der Coinfektionsversuche von *Candida albicans* (CA) und *Aspergillus fumigatus* (AF). Zu je 10^6 DNA-Molekülen von CA wurden DNA-Moleküle von AF zugegeben: beginnend bei 10^6 DNA-Molekülen wurden absteigende Molekülmengen bis zu einem AF-DNA-Molekül zugegeben. Ebenso war es mit den CA-Molekülnumern 10^5 Moleküle bis ein Molekül: beginnend mit einem 1:1 Verhältnis wurden absteigende Molekülmengen von AF zugegeben bis von beiden Spezies nur ein Molekül vorlag. NK1: Negativkontrolle der ersten PCR der *Nested-PCR*, die als Probe in der zweiten PCR der *Nested-PCR* eingesetzt wurde. NK2: Negativkontrolle der zweiten PCR der *Nested-PCR*. M = 100 bp DNA-Marker in 100 bp-Schritten. PCR-Produkte mit einer ungefähren Größe von 340 bp sind bis zu 10^1 DNA-Moleküle, die als PCR-Template eingesetzt wurden, festzustellen.

Die Hybridisierungen der Negativkontrollen der zweiten PCR (NK2) zeigten keinerlei Signalen auf Sonden des finalen Mikroarrays. Die Negativkontrollen der ersten PCR nach Amplifizierung in der zweiten PCR der *Nested-PCR* (NK1) zeigte hingegen Signale auf den Sonden für *Trichosporon cutaneum/mucoides* L961__Trspo_mucG2_ITS_rc mit einer gemittelten Intensität von 2.077 a.u. und einer Standardabweichung

chung von 1.972 a.u. Die hohen Werte der Standardabweichung zeigten, dass das unspezifische Signal lediglich bei einem der beiden technischen Replikate auftrat.

Bei allen Verdünnungsstufen von *Candida albicans* - bis auf die Probe mit nur einem DNA-Molekül - waren Signale auf der zugehörigen Antisense-Sonde G986__Can_albi ITS_rc festzustellen. Hier war zudem kein Signal auf der *Aspergillus fumigatus*-Antisense-Sonde L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc zu erkennen. Lagen DNA-Moleküle von *Aspergillus fumigatus* in einem Verhältnis zur *C. albicans*-DNA von 1:1 und 1:10 vor, waren zudem Signale auf der *A. fumigatus*-Antisense-Sonde L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc zu erkennen. Dies konnte sowohl bei hohen DNA-Ausgangsmengen beginnend bei 10^6 Molekülen bis hin zu sehr geringen, klinisch relevanteren Mengen von 10^3 DNA-Molekülen festgestellt werden. Bei DNA-Ausgangsmengen von 10^2 und zehn Molekülen war bei einem Mischverhältnis von 1:10 kein gemittelttes Signal von über 1.000 a.u. feststellbar. Nur bei einem 1:1-Verhältnis der DNA beider Spezies waren Signale auf beiden Sonden zu ermitteln (vgl. Abbildung 36).

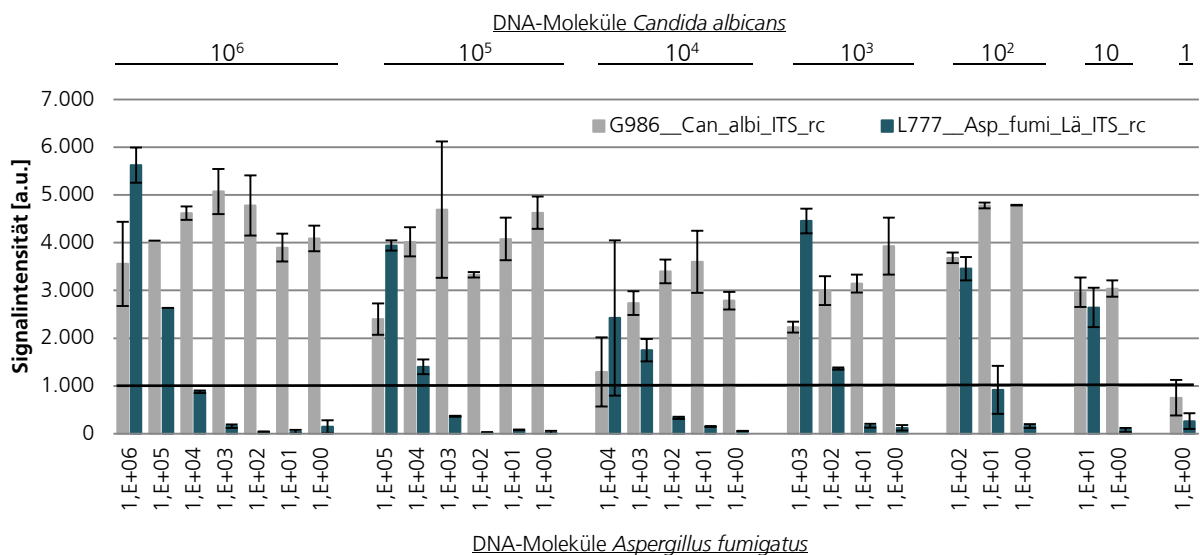


Abbildung 36: Coinfektionsversuche anhand DNA von *Candida albicans* (CA) und *Aspergillus fumigatus* (AF). Zu je 10^6 DNA-Molekülen von CA wurden DNA-Moleküle von AF zugegeben: beginnend bei 10^6 Molekülen wurde absteigende Molekülmengen bis zu einem AF-DNA-Molekül zugegeben. Ebenso war es mit den CA-Molekülzahlen 10^5 bis 1 Molekül: beginnend mit einem 1:1 Verhältnis wurden absteigende Molekülmengen von AF zugegeben bis von beiden Spezies nur ein Molekül vorlag. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$). Bei 1.000 a.u. wurde zur Verdeutlichung des Detektionsschwellenwertes eine Linie gezogen. PCR-Produkte beider Spezies führten bei einem DNA-Mischverhältnis von 1:1 und 1:10 zu Signalen auf Sonden für beide Spezies auf dem Mikrarray. Bei einem Misch-Verhältnis unter 1:10 waren lediglich Signale für das Primärpathogen CA festzustellen.

5.7.4 Ergebnisse der *Nested-PCR* verglichen mit den Ergebnissen von *Single-* und *Multiplex-PCR*

Die *Nested-PCR* führte zu einer wesentlichen Erhöhung der Sensitivität der Sonden: selbst bei geringen DNA-Mengen konnten Signale detektiert werden. Um die Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität der *Nested-PCR* beurteilen zu können, wurden diese mit den Ergebnissen der Vergleichsstudie der *Single-* und *Multiplex-PCR* verglichen. Die *Single-* und *Multiplex-PCR* wurden mit 30 ng DNA der Referenzspezies, ohne humanen DNA-Hintergrund durchgeführt (vgl. Tabelle 11, Tabelle 12 und Tabelle 15, Tabelle 16), wohingegen die *Nested-PCR* mit 3 ng fungaler DNA und 100 ng humaner HeLa-DNA durchgeführt wurde (vgl. Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19). Jede PCR wurden mit 30 Zyklen durchgeführt. In Summe wurde DNA von 52 Spezies mit vier unterschiedlichen PCR-Protokollen amplifiziert. Es wurde die gesamte ITS-Region mit dem Primerpaar ITS 1+4 amplifiziert (*Singleplex-PCR* ITS 1+4), es wurde nur ein Spacer der ITS-Region mit den Primerpaaren ITS 1+2 oder ITS 3+4 amplifiziert (*Singleplex-PCR* ITS 1+2/3+4), alle vier ITS-Primer wurden in einer *Multiplex-PCR* für die Amplifizierung eingesetzt (*Multiplex-PCR* ITS1+2+3+4) und es wurde die *Nested-PCR* durchgeführt. Dabei wurde zunächst die gesamte ITS-Region amplifiziert. In einer zweiten sich anschließenden PCR wurde entweder der ITS-Spacer ITS 1 oder ITS2 amplifiziert.

Die *Single-* und *Multiplex-PCR* wurden mit je 30 ng fungaler DNA ohne humane DNA-Last durchgeführt, wohingegen die *Nested-PCR* mit 3 ng fungaler DNA und zusätzlicher Fremd-DNA-Last durchgeführt wurden. Die *Nested-PCR* zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, d.h. es wurden selbst bei sehr geringen DNA-Template-Mengen spezifische PCR-Produkte generiert (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 23). Aus gegebenem Anlass wurde die Vergleichbarkeit der Protokolle untersucht. Die PCR-Produktmengen, die unter Verwendung von 3 ng Template-DNA innerhalb der *Nested-PCR* und 30 ng Template-DNA innerhalb der *Singleplex-PCR* (vgl. Spur 1 in Abbildung 14) und *Multiplex-PCR* (Daten nicht gezeigt) entstanden, wurden nach Auftrennung durch Agarosegelen miteinander verglichen. Die Amplifikation der DNA lief unter Verwendung unterschiedlicher Template-DNA-Mengen und Protokollen sehr effizient ab: es wurden qualitativ betrachtet maximale und vergleichbare Produktmengen produziert. Unter Verwendung des Protokolls der *Nested-PCR* waren selbst bei wesentlich geringeren Template-DNA-Mengen vergleichbare maximale Produktmengen auf dem Agarosegel zu ermitteln vgl. Abbildung 17 und Abbildung 23). Da die Template-DNA-Menge von 3 ng einer klinisch relevanteren Größenordnung der Erregerzahl in Patientenproben entspricht, wurden die Versuche der *Nested-PCR* mit dieser geringeren DNA-Menge durchgeführt. Zudem wurden Versuche zur Amplifikation humaner DNA durch die ITS-Primer innerhalb von *Singleplex-PCR* (vgl. Spur 2 in Abbildung 14) und *Multiplex-PCR* (Daten nicht gezeigt) durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass es zu keiner Amplifikation der HeLa-DNA durch die unterschiedlichen Primerpaare kam. Die *Nested-PCR* zeigte ebenfalls keine Amplifikationen der humanen DNA unter Verwendung des Primerpaares ITS 1+2 in der zweiten *PCR* der *Nested-PCR* (vgl. Abbildung 17). Wurde das Primerpaar ITS 3+4 in der zweiten *PCR* der *Nested-PCR* eingesetzt, waren bei hohen Template-DNA-Mengen, die 3 ng DNA entsprachen, keine unspezifischen Amplifikationen festzustellen. Erst bei geringen Template-DNA-Mengen von weniger als 10^3 DNA-Molekülen waren unspezifische PCR-Produkte auf dem Agarosegel festzustellen (vgl. Abbildung 23). Somit waren bei allen vier Protokollen, *Singleplex-PCR* mit den Primerpaaren ITS 1+2 und ITS 3+4, *Multiplex-PCR* und *Nested-PCR* vergleichbare PCR-Produktmengen trotz

Verwendung von 30 ng bzw. 3 ng Template-DNA sowie keine Amplifikationen durch HeLa-DNA bei diesen Template-DNA-Mengen festzustellen, sodass ein Vergleich der Protokolle möglich war.

Unter Verwendung der vier unterschiedlichen Protokolle zeigten 22 Spezies ausschließlich spezifische Signale. Davon waren bei 18 Spezies die höchsten Intensitäten durch Verwendung der *Nested-PCR* festzustellen. Drei Spezies zeigten die höchsten Signalintensitäten durch die *Multiplex-PCR*: *Candida albicans*, *Penicillium marneffeii* und *Pseudallescheria boydii*. *Saccharomyces cerevisiae* zeigte bei der Amplifizierung der gesamten ITS-Region durch das Primerpaar ITS 1+4 die höchsten Intensitätswerte (vgl. Tabelle 36 und Tabelle 63 im Anhang).

Tabelle 36: Ergebnisse der *Nested-PCR* verglichen mit den Ergebnissen der Vergleichsstudie von *Singleplex-PCR*, *Multiplex-PCR* ohne unspezifische Signale. Die Tabelle zeigt die Signalintensitäten der spezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies. Signale, die durch die vier PCR-Protokolle erreicht wurden, sind nach ihrer Intensität in geringste Intensität (+), mittlere Intensität (++) und hohe Intensität (+++) und höchste Intensität (++++) für jede Spezies unterteilt. Grau unterlegte Felder repräsentieren das Vorkommen unspezifischer Signale.

Spezies	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>	<i>Nested-PCR</i>
	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Candida famata</i>	+++	++	+	++++
<i>Candida krusei</i>	+++	++	+	++++
<i>Candida pulcherrima</i>	+++	++	+	++++
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	+++	++	+	++++
<i>Sporothrix schenckii</i>	+++	++	+	++++
<i>Candida tropicalis</i>	+++	+	++	++++
<i>Mucor pusillus</i>	+++	+	++	++++
<i>Rhizopus microsporus</i>	+++	+	++	++++
<i>Rhodotorula minuta</i>	+++	+	++	++++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++++	+	++	+++
<i>Candida dubliniensis</i>	+++	+	++	++++
<i>Candida parapsilosis</i>	+++	+	++	++++
<i>Candida albicans</i>	++	+	++++	+++
<i>Candida glabrata</i>	++	+	+++	++++
<i>Candida lusitanae</i>	++	+	+++	++++
<i>Candida metapsilosis</i>	++	+	+++	++++
<i>Candida orthopsilosis</i>	++	+	+++	++++
<i>Dipodascus capitatus</i>	++	+	+++	++++
<i>Mucor hiemalis</i>	++	+	+++	++++
<i>Penicillium marneffeii</i>	+++	+	++++	++
<i>Pseudallescheria boydii</i>	+++	+	++++	++
<i>Trichosporon mucoides</i>	++	+	+++	++++

Bei vier Spezies waren durch die *Nested-PCR* unspezifische Signale festzustellen, die sowohl bei den *Singleplex-PCR* als auch bei der *Multiplex-PCR* nicht auftraten: *Candida guilliermondii*, *Epidermophyton floccosum*, *Mucor racemosus* und *Paracoccidioides brasiliensis*. Die *Nested-PCR* zeigte bei diesen Spezies zudem die höchsten spezifischen Signale (vgl. Tabelle 25 und Tabelle 37 sowie Tabelle 64 im Anhang).

Tabelle 37: Ergebnisse der *Nested-PCR* verglichen mit den Ergebnissen der Vergleichsstudie von *Single-* und *Multiplex-PCR* mit zusätzlichen unspezifischen Signalen durch die *Nested-PCR*. Die Tabelle zeigt die Signalintensitäten der spezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies. Signale, die durch die vier PCR-Protokolle erreicht wurden, sind nach ihrer Intensität in geringste Intensität (+), mittlere Intensität (++) und hohe Intensität (+++) und höchste Intensität (++++) für jede Spezies unterteilt. Grau unterlegte Felder repräsentieren das Vorkommen unspezifischer Signale.

Spezies	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>	<i>Nested-PCR</i>
	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Candida guilliermondii</i>	+++	+	++	++++
<i>Epidermophyton floccosum</i>	++	+	+++	++++
<i>Mucor racemosus</i>	+++	++	+	++++
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	+++	+	++	++++

Weitere 18 Spezies wiesen neben spezifischen Signalen zudem Signale auf Sonden für andere Spezies auf. Diese unspezifischen Signale waren bei zwölf Spezies nur nach Hybridisierung von PCR-Produkten der *Multiplex-PCR* festzustellen. Acht dieser zwölf Spezies zeigten durch die *Nested-PCR* die höchsten spezifischen Signalintensitäten. *Aspergillus niger*, *Cryptococcus gattii*, *A. fumigatus* und *A. flavus* wiesen hingegen durch die *Multiplex-PCR* die höchsten Intensitätswerte auf. Die *Nested-PCR* zeigte nach Hybridisierung von sechs Spezies neben spezifischen zudem unspezifische Signale und erreichte bei 14 von 18 Spezies die höchsten spezifischen Signalintensitäten. Bei *Candida kefyr* trat mehr als eine Sonde als unspezifisches Signal auf: eine Spezies erreichte die höchste Signalintensität durch die Hybridisierung der gesamten ITS-Region durch das Primerpaar ITS 1+4 wohingegen das zweite unspezifische Signal die höchste Signalintensität durch die *Nested-PCR* aufwies (vgl. Tabelle 38 und Tabelle 65 im Anhang).

Tabelle 38: Ergebnisse der *Nested-PCR* verglichen mit den Ergebnissen der Vergleichsstudie von *Single-* und *Multiplex-PCR* mit unspezifischen Signalen. Die Tabelle zeigt die Signalintensitäten der spezifischen und unspezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies. Signale, die durch die vier PCR-Protokolle erreicht wurden, sind nach ihrer Intensität in geringste Intensität (+), mittlere Intensität (++) , hohe Intensität (+++) und höchste Intensität (++++) für jede Spezies unterteilt. Grau unterlegte Felder repräsentieren das Protokoll mit der höchsten Signalintensität unspezifischer Sonden. Zeigen mehrere unspezifische Sonden die maximale Intensität nach Verwendung unterschiedlicher Protokolle, sind mehrer Felder innerhalb einer Spezies grau unterlegt.

Spezies	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>	<i>Nested-PCR</i>
	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Absidia spinosa</i>	++	+	+++	++++
<i>Aspergillus terreus</i>	++	+	+++	++++
<i>Trichosporon cutaneum</i>	+++	+	++	++++
<i>Trichosporon asahii</i>	+++	++	+	++++
<i>Trichosporon asteroides</i>	+++	++	+	++++
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	+++	++	+	++++
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	+++	++	+	++++
<i>Fusarium solani</i>	++	+	+++	++++
<i>Aspergillus niger</i>	++	+	++++	+++
<i>Cryptococcus gattii</i>	++	+	++++	+++
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	++	++++	+++

Spezies	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR	Nested-PCR
	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+++	++++	++
<i>Candida kefyr</i>	+++	++	+	++++
<i>Absidia cylindrospora</i>	+++	+	++	++++
<i>Absidia glauca</i>	+++	+	++	++++
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	+++	+	++	++++
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	+++	+	++	++++
<i>Absidia caerulea</i>	++	+	+++	++++

Bei acht Spezies waren durch die *Nested-PCR* weniger bzw. zusätzliche unspezifische Signale festzustellen. *Mucor plumbeus*, *Arthroderma gypseum* und *Rhizopus stolonifer* wiesen bei der *Singleplex-* oder *Multiplex-PCR* unspezifische Signale auf einer Sonde auf, die bei der *Nested-PCR* nicht festzustellen waren. Hier lagen die gemittelten Intensitäten der Sondensignale unter 1.000 a.u. Alle drei Spezies wiesen die höchsten spezifischen Signalintensitäten durch die *Nested-PCR* auf. Bei den Spezies *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* und *Rhizopus oryzae* waren unspezifische Signale auf Sonden für andere Spezies, als die hybridisierte Spezies festzustellen. Diese unspezifischen Signale waren unter Verwendung aller drei Protokolle zu ermitteln. Allerdings gab es auch verschiedene unspezifische Signale bei der Hybridisierung der drei genannten Spezies, die unter Verwendung des Protokolls der *Nested-PCR* nicht festzustellen waren.

Wiesen *T. mentagrophytes* und *R. oryzae* die höchsten spezifischen Intensitätswerte durch die *Nested-PCR* auf, zeigten sich diese bei *T. tonsurans* durch die *Multiplex-PCR*. Wurden die PCR-Produkte von *Trichophyton rubrum* hybridisiert war ein - durch *Singleplex-* oder *Multiplex-PCR* auftretendes - unspezifisches Signal bei der *Nested-PCR* nicht nachzuweisen, wohingegen durch dieses Protokoll zwei weitere unspezifische Signale auftraten. Zudem zeigten sich die höchsten spezifischen Intensitätswerte durch besagtes Protokoll. Für *Malassezia furfur* konnten durch die *Singleplex-* oder *Multiplex-PCR* insgesamt sechs verschiedene unspezifische Signale festgestellt werden. Drei davon zeigten auch bei der *Nested-PCR* Intensitäten über 1.000 a.u., für drei weiteren Sonden konnten durch dasselbe Protokoll keine Signale über 1.000. a.u. ermittelt werden. Die höchsten spezifischen Signalintensitäten konnten durch die *Multiplex-PCR* erzielt werden (vgl. Tabelle 39 und Tabelle 66 im Anhang).

Tabelle 39: Ergebnisse der *Nested-PCR* verglichen mit den Ergebnissen der Vergleichsstudie von Single- und *Multiplex-PCR* mit abweichenden unspezifischen Signalen. Die Tabelle zeigt die Signalintensitäten der spezifischen und unspezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies. Signale, die durch die vier PCR-Protokolle erreicht wurden, sind nach ihrer Intensität in geringste Intensität (+), mittlere Intensität (++) , hohe Intensität (+++) und höchste Intensität (++++) für jede Spezies unterteilt. Grau unterlegte Felder repräsentieren das Protokoll mit der höchsten Signalintensität unspezifischer Sonden. Zeigen mehrere unspezifische Sonden die maximale Intensität nach Verwendung unterschiedlicher Protokolle, sind mehrer Felder innerhalb einer Spezies grau unterlegt.

Spezies	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>	<i>Nested-PCR</i>
	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Arthroderma gypseum</i>	++	+	+++	++++
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+++	++	+	++++
<i>Trichophyton rubrum</i>	+++	+	++	++++
<i>Malassezia furfur</i>	+++	+	++++	++
<i>Mucor plumbeus</i>	++	+	+++	++++
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	++	+	+++	++++
<i>Rhizopus oryzae</i>	+++	+	++	++++
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+	+++	++++	++

5.7.5 Statistische Betrachtung des finalen *PCR-Array-Systems*

Das finale *PCR-Array-System* setzt sich aus dem PCR-Protokoll der *Nested-PCR* (vgl. Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19) zur Amplifikation der Zielsequenzen der ITS-Region sowie 96 ITS-Sonden des entwickelten DNA-Mikroarrays (vgl. Tabelle 50 im Anhang) zusammen. Für eine statistische Betrachtung des finalen *PCR-Array-Systems* wurden die ermittelten Signale in richtig-positive (RP-), falsch-positive (FP-), falsch-negative (FN-) und richtig-negative (RN-) Signale eingeteilt, die RP- und RN-Rate sowie der Positive Vorhersagewert (PV-Wert) und Negative Vorhersagewert (PV-Wert) berechnet. In die Betrachtung flossen die Intensitätswerte der einzelnen Replikate ein: zeigte einer der Duplikatswerte Intensitäten unter 1.000 und der zweite Replikatswerte Intensitäten über 1.000 wurde ein RP- und ein FN-Signal in die Berechnung miteinbezogen. Die RP-Rate des finalen *PCR-Array-Systems* betrug 100 %, das bedeutet, dass die DNA der einzelnen Spezies in jedem Fall richtig identifiziert wurde. Die RN-Rate des Systems gab an, dass in 99 % der Fälle die fehlende DNA einer Spezies tatsächlich negativ detektiert werden konnte. Der positive Vorhersagewert (PV-Wert) bezieht sich auf die Gesamtheit der ermittelten Signale und gibt Aufschluss darüber in wie vielen Fällen die RP-Signale tatsächlich korrekt waren. Dieser Wert lag bei den finalen *PCR-Array-System* bei 65 % (vgl. Tabelle 40). Verglichen mit den RP-Raten der *Singleplex-PCR* und *Multiplex-PCR* zeigt die *Nested-PCR* mit 100 % die höchste Wahrscheinlichkeit einer richtigen Identifizierung. Mit einer RN-Rate von 99 % kann die *Nested-PCR*, ebenso wie die *Singleplex-PCR* mit dem Primerpaar ITS 1+4 zur Amplifikation der gesamten ITS-Region, fehlende DNA einer Spezies eindeutig negativ detektieren, wohingegen die beiden anderen Protokolle eine höhere Wahrscheinlichkeit von 100 % aufzeigen. Die *Nested-PCR* zeigt mit einem PV-Wert von 65 % die geringste Wahrscheinlichkeit darüber an, in wie vielen Fällen die RP-Signale tatsächlich korrekt waren. Eine Erhöhung des PV-Wertes der *Nested-PCR* kann bei monomikrobiellen Infektionen durch die *Zwei-Sonden-Diskriminierung* erreicht werden (vgl. 6.3.4). Vergleicht man die Sensitivität der verschiedenen Protokolle, so ist ein zuverlässiger Nachweis von mindestens zehn fungalen DNA-Molekülen ausschließlich durch die *Nested-PCR* möglich (vgl. 5.6).

Tabelle 40: Statistische Bewertung der Vergleichsstudie von *Singleplex-PCR*, *Multiplex-PCR* und *Nested-PCR*. Gezeigt ist die Anzahl richtig-positiver Signale (RP), falsch-positiver Signale (FP), falsch-negativer Signale (FN), richtig-negativer Signale (RN), das prozentuale Ergebnis der Richtig-Positiv-Rate (RP-Rate), der Richtig-Negativ-Rate sowie die Ergebnisse des Positiven-Vorhersage-Wertes (PV-Wert) der Hybridisierungsergebnisse nach Amplifikation fungaler DNA durch die Protokolle der *Singleplex-PCR* mit den Primerpaaren ITS 1+2 oder ITS 3+4 bzw. ITS 1+4, *Multiplex-PCR* mit den Primern ITS 1+2+3+4 und *Nested-PCR*.

	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>	<i>Nested-PCR</i>
	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
RP	110	106	112	110
FP	18	42	1	58
FN	4	7	70	0
RN	5176	5304	5304	5448
RP-Rate	96 %	94 %	62 %	100 %
RN-Rate	100 %	99 %	100 %	99 %
PV-Wert	86 %	72 %	99 %	65 %

5.8 Evaluierung des PCR-Array-Systems mit DNA von Patientenproben

Die Evaluierung des Arrays inklusive der Amplifikationsprotokolle wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Knabbe und Dr. Weile (Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen HDZ) anhand von Patientenproben durchgeführt. Bei den Proben handelte es sich um DNA aus Trachealsekreten (TS) oder Bronchoalveolären Lavages (BAL), die am HDZ gewonnen wurden. Zu jeder Probe lag der mikrobiologische Befund der Patienten vor. Der Befund wurde u.a. durch Wachstum der Erreger auf/in Fest- und Flüssigmedien für *Candida* Spezies und zusätzlich mit Mikroskopie-Techniken für *Aspergillus* Spezies ermittelt. Dafür verwendete Medien waren u.a. Blut-, Schoko- und Chromagar (vgl. 3.4.1, Abbildung 7) sowie Thio- und Hirn-Herz-Bouillon. Einzelne Kulturen wurden mittels Massenspektrometrie oder über die DNA mittels Sequenzierungen identifiziert.

Die automatisierte Isolierung der Gesamt-DNA der Patientenproben wurde mittels des NucliSENS® easyMAG™ von bioMérieux durchgeführt, die ca. eine Stunde für eine bzw. mehrere Proben parallel in Anspruch nahm. Das Endvolumen der aufgearbeiteten Patientenproben betrug je 55 µl wässrige DNA-Lösung. Der mikrobiologische Befund gab neben der identifizierten Spezies zudem Aufschluss über die ungefähre Zellzahl der Pathogene, die nach Kultivierung der Proben festgestellt werden konnten. Angegeben waren definierte Zellzahlen wie beispielsweise 10^3 Kolonien bildende Einheiten KBE/ml oder lediglich ungefähre Angaben wie *viel*, *wenig*, *mäßig* oder *vereinzelt*. Neben fungalen Spezies konnten teilweise bakterielle Spezies mikrobiologisch identifiziert werden (vgl. Tabelle 67). Das finale Primer- und Sonden-system ist pilzspezifisch, sodass bakterielle Spezies nicht nachgewiesen wurden. Die PCR wurde durch die bakterielle DNA nicht negativ beeinflusst. Für alle Proben wurden jeweils technische Duplikate generiert. Die Signalintensitäten der Replikate wurden gemittelt und die Standardabweichung dieser berechnet.

Je Versuch wurden 10 µl DNA in die *Nested-PCR* eingesetzt. Die erste PCR der *Nested-PCR* unterschied sich von dem Standardprotokoll (vgl. Tabelle 17) durch das erhöhte DNA-Volumen von 10 µl und dadurch, dass keine humane HeLa-DNA eingesetzt wurde (vgl. Tabelle 41). Je 1 µl des ersten PCR-Produktes wurden als Template in die zweite PCR eingesetzt (vgl. Tabelle 18). Es wurde für beide PCR das Standard-Cycler-Protokoll verwendet (vgl. Tabelle 19). Da Sonden innerhalb beider ITS-Spacer für die Hybridisierung zur Verfügung stehen sollten, wurden beide PCR mit den Primerpaaren ITS 1+2 und ITS 3+4 mit jeder Probe durchgeführt. Beide PCR-Produkte wurden anschließend vereinigt und gemeinsam hybridisiert: Je 10 µl der PCR-Produkte wurden mit 65 µl Hybridisierungspuffer-A homogenisiert und für die Hybridisierung auf die Schablone pipettiert (vgl. 4.2.12). Die Arrays wurden bei 50°C für eine Stunde inkubiert, nach den Standardprotokollen gewaschen und die Signale ausgelesen (vgl. 4.2.12 und 4.2.13).

Tabelle 41: Erste PCR der *Nested-PCR* mit klinischen Proben

PCR-Protokoll: 25 µl Ansatz	Volumina (µl):	Konzentration im Endvolumen von 25 µl
<i>Aqua moleculare</i>	3,95	
5X GoTaq® Green Reaction Buffer	5,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,25	0,5 mM jeweils
Primer _{forward} (10 µM): ITS 1	1,0	0,4 µM
Primer _{reverse} (10 µM): ITS 4	1,0	0,4 µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0,3	1,5 u
DNA	10,0	

Der finale Mikroarray wurde mit 102 Patientenproben evaluiert: 28 BAL-Proben und 74 Trachealsekrete (vgl. Tabelle 67). Bei 53 Proben konnte der mikrobiologische Befund unverändert bestätigt werden, davon waren 37 monomikrobiellen Infektionen zuzuordnen und 16 polymikrobiellen. Weitere Spezies zu den mittels mikrobiologischen Methoden identifizierten Organismen konnten anhand des Mikroarrays bei 23 Proben ermittelt werden, d.h. der mikrobiologische Befund konnte hier erweitert werden. Bei weiteren 23 Proben wurden mittels Array weniger Spezies als durch mikrobiologische Methoden identifiziert. Nur drei Proben zeigten komplett abweichende Array-Befunde. Zudem konnten die durch Chromagar als nicht-*albicans Candida* identifizierten Spezies in 39 Fällen exakt identifiziert werden.

5.8.1 Bestätigung des mikrobiologischen Befunds monomikrobieller Infektionen

Der mikrobiologische Befund von 53 Trachealsekret- und BAL-Proben konnte mit dem entwickelten *PCR-Array-System* bestätigt werden. Bei 37 Proben lag eine monomikrobielle Infektion vor, die sowohl mikrobiologisch am HDZ als auch molekular mittels Mikroarray in dieser Arbeit identifiziert werden konnte. 23 der monomikrobiellen Infektionen wurden eindeutig mittels Chromagar am HDZ speziesspezifisch diagnostiziert. Dabei handelte es sich hauptsächlich um *Candida albicans* sowie weitere *Candida* Spezies wie *C. tropicalis* und *C. parapsilosis*. Diese 23 Fälle wurden in dieser Arbeit ebenfalls mittels des entwickelten Arrays bestätigt. In 21 Fällen traten die Signale auf den zugehörigen Antisense-Sonden auf, lediglich zwei Signale wurden auf den Sense-Sonden festgestellt. Für eine klinische Diagnostik-Anwendung des Arrays sollten zur Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse beide Konfigurationen der Sonden, also Sense- und Antisense-Sonde, gespottet werden (siehe auch 6.3). Die ermittelten Signalintensitäten reichten von 1.815 a.u. bis 52.755 a.u., wobei die Mehrzahl der Sonden Signalintensitäten zwischen 5.000 a.u. und 10.000 a.u. zeigten (vgl. Abbildung 37).

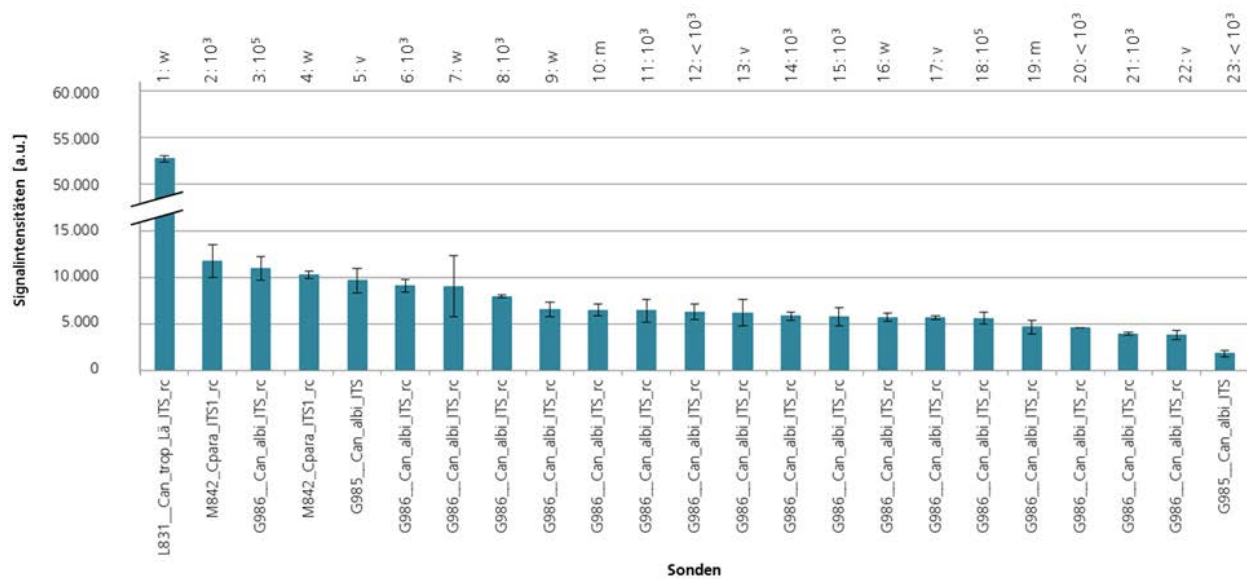


Abbildung 37: Signalintensitäten hybridisierter *Nested-PCR*-Produkte monomikrobieller Patientenproben, deren Befund bestätigt werden konnte. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung (n=2). Die Angaben des mikrobiologischen Befundes bezüglich der KBE/ml sind oberhalb dargestellt: mäßig (m), wenig (w), vereinzelt (v).

Handelte es sich bei den kultivierten monomikrobiellen Patientenproben nicht um *Candida albicans*, lautete der Befund in 14 Fällen Nicht-*albicans Candida* Spezies. Anhand der Sonden des finalen Mikroarrays war hier eine spezifischere Identifizierung möglich. Es konnten folgende Nicht-*albicans Candida* Spezies diagnostiziert werden: *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata*. Die Signalintensitäten lagen zwischen 1.261 a.u. und 48.439 a.u. Bei zwei Patientenproben wurde *C. krusei* mit sehr hohen Signalintensitäten von über 40.000 a.u. auf der zugehörigen Antisense-Sonde I741_C_krusei ITS_rc nachgewiesen. Die Signalintensitäten der *Candida* Spezies *C. lusitanae*, *C. dubliniensis* und *C. parapsilosis* wurden auf den zugehörigen Antisense-Sonden mit Intensitätswerten zwischen 6.000 a.u. und 22.000 a.u. ermittelt. Nicht-*albicans Candida* Patientenproben mit arraybasierter *Candida glabrata*-Diagnose zeigten sowohl auf der Sense- als auch auf der Antisense-Sonde Signale mit Intensitätswerten unter 4.000 a.u. (vgl. Abbildung 38).

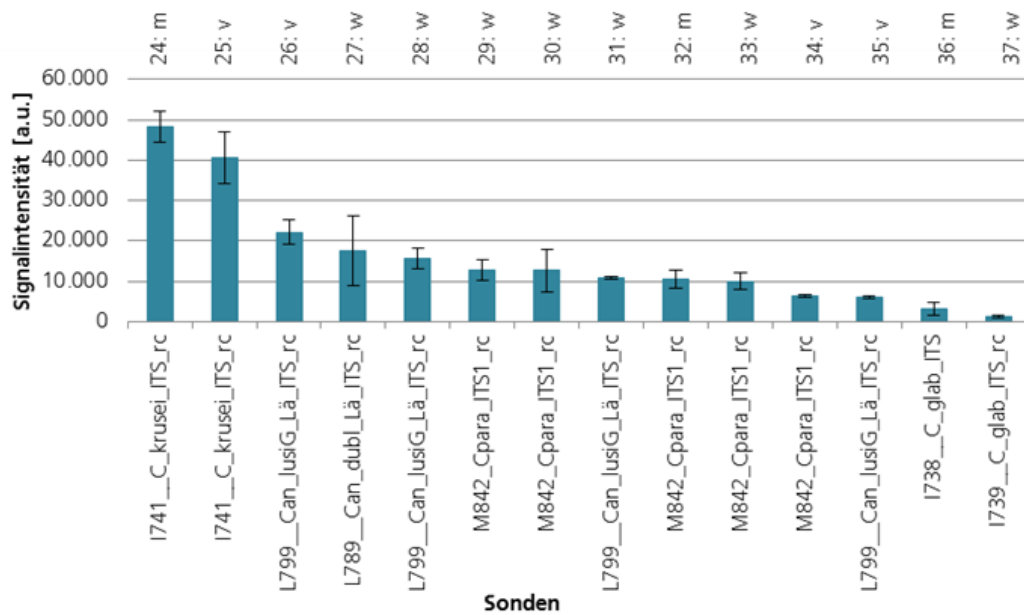


Abbildung 38: Signalintensitäten hybridisierter *Nested-PCR*-Produkte monomikrobieller Patientenproben, deren Befund Nicht-*albicans Candida* Spezies spezifischer mittels Mikroarray diagnostiziert werden konnte. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$). Die Angaben des mikrobiologischen Befundes bezüglich der KBE/ml sind oberhalb dargestellt: mäßig (m), wenig (w), vereinzelt (v).

5.8.2 Bestätigung des mikrobiologischen Befunds polymikrobieller Infektionen

Der mikrobiologische Befund von 16 polymikrobiellen Infektionen konnte mittels des entwickelten Mikroarray-System bestätigt werden. Davon konnten in 13 Proben jeweils zwei unterschiedliche Spezies und in drei Proben jeweils drei Spezies diagnostiziert werden. Auch bei polymikrobiellen Infektionen wurden Nicht-*albicans Candida* Spezies mikrobiologisch identifiziert, die durch Sonden des finalen Mikroarrays in elf Fällen eindeutig unterschiedlichen *Candida* Spezies zugeordnet werden konnten: *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata*. Neun weitere Proben enthielten neben Nicht-*albicans Candida* Spezies zudem die Spezies *C. albicans*, eine weitere *A. fumigatus*. Auch diese konnten durch Sonden des finalen Mikroarrays bestätigt werden (vgl. Tabelle 42). Bis auf die Signale der *C. albicans*-Sense-Sonde G985__Can_albi ITS, waren alle weiteren Signale auf den Antisense-Sonden festzustellen (vgl. Abbildung 39 im Anhang). Das Vorkommen noch Signalen auf Sense- und Antisense-Sonden bestätigt die Notwendigkeit des Spottens beider Sondenkonfigurationen, um falsch-negative Signale zu vermeiden (vgl. auch 6.3).

Tabelle 42: Vergleich des mikrobiellen Befundes mit dem Resultat des Mikroarrays bei polymikrobiellen Infektionen. TS = Trachealsekret, BAL = Bronchoalveoläre Lavage. + = Nicht-*albicans* *Candida* Spezies (NAC spp.) konnten mittels Mikroarray weiter differenziert werden. Der Befund konnte bestätigt werden (✓). Die Angaben des mikrobiologischen Befundes bezüglich der KBE/ml sind in Klammern dargestellt: mäßig (m), wenig (w), vereinzelt (v).

Probe		Mikrobieller Befund			Array-Befund			Vergleich Befunde		
38	BAL	<i>C. albicans</i> (< 10 ³)	NAC spp. (< 10 ³)		<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>		✓	+	
39	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (m)		<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>		✓	+	
40	TS	NAC spp. (w)			<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>		+	+	
41	TS	NAC spp. (w)			<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>		+	+	
42	TS	<i>C. albicans</i> (w)	<i>C. tropicalis</i> (w)		<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>		✓	✓	
43	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>		✓	+	
44	TS	NAC spp. (w)			<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>		+	+	
45	TS	<i>A. fumigatus</i> (w)	NAC spp. (v)		<i>A. fumigatus</i>	<i>C. tropicalis</i>		✓	+	
46	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>		✓	+	
47	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>		✓	+	
48	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>		✓	+	
49	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>		✓	+	
50	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>		✓	+	
51	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	✓	+	+
52	TS	NAC spp. (w)			<i>C. tropicalis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+
53	BAL	<i>A. fumigatus</i> (< 10 ³)	<i>C. albicans</i> (10 ³)	NAC spp. (10 ³)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	✓	✓	+

Die Signalintensitäten der Sonden, die in einer Patientenprobe zu Signalen führten, wurden in Abbildung 39 nebeneinander aufgetragen. Sie sind einzeln und nicht vergleichend miteinander zu betrachten, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Signale aller Sonden selbst bei hohen DNA-Mengen von 3 ng unterschiedliche Intensitäten aufwiesen (vgl. 5.7, Abbildung 30). Eine Quantifizierung ist deshalb nicht möglich.

Die geringste Intensität von 1.217 a.u. konnte auf der Sense-Sonde für *C. albicans* G985__Can_albi ITS festgestellt werden (Probe 43). Es handelte sich dabei um das einzige Signal auf der zugehörigen Sense-Sonde. Alle weiteren Signale polymikrobieller Patientenproben, deren Befund bestätigt werden konnte, wurden auf Antisense-Sonden beobachtet. Dies zeigt wieder die Notwendigkeit des Spottens beider Sondenkonfigurationen, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden. Die Intensität des SONDENSIGNALS für *C. albicans* liegt nur knapp über dem Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. Die Sonde für *C. albicans* zeigte selbst bei hohen Referenz-DNA-Konzentrationen nur geringe Intensitätswerte (vgl. Abbildung 30). Bei Sonden, die bei hohen Template-DNA-Mengen bereits Intensitäten nahe des Detektionsschwellenwertes aufzeigten, ist die Wahrscheinlichkeit höher, bei niedrigeren Template-DNA-Mengen unterhalb des Detektionsschwellenwertes von 1.000 a.u. zu liegen. Dies würde zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Das höchste gemittelte Signal wurde auf der Antisense-Sonde für *C. krusei* I741__C_krusei ITS_rc mit einer Intensität von 47.085 a.u. festgestellt (Probe 38). Die Standardabweichung der *C. krusei*-Antisense-Sonde I741__C_krusei ITS_rc zeigte identische Intensitätswerte wie das zugehörige Signal selbst (Probe 44) (vgl. Abbildung 39). Dies bedeutet, dass lediglich ein von zwei Replikaten zu Signalintensitäten über dem Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. führte. Die Ergebnisse der Coinfektionsversuche zeigte zu-

dem, dass DNA eines sekundären Erregers mindestens in einem Verhältnis von 1:10 zur DNA des primären Erregers vorliegen muss, um Signale für beide Erreger detektieren zu können (vgl. 5.7.3).

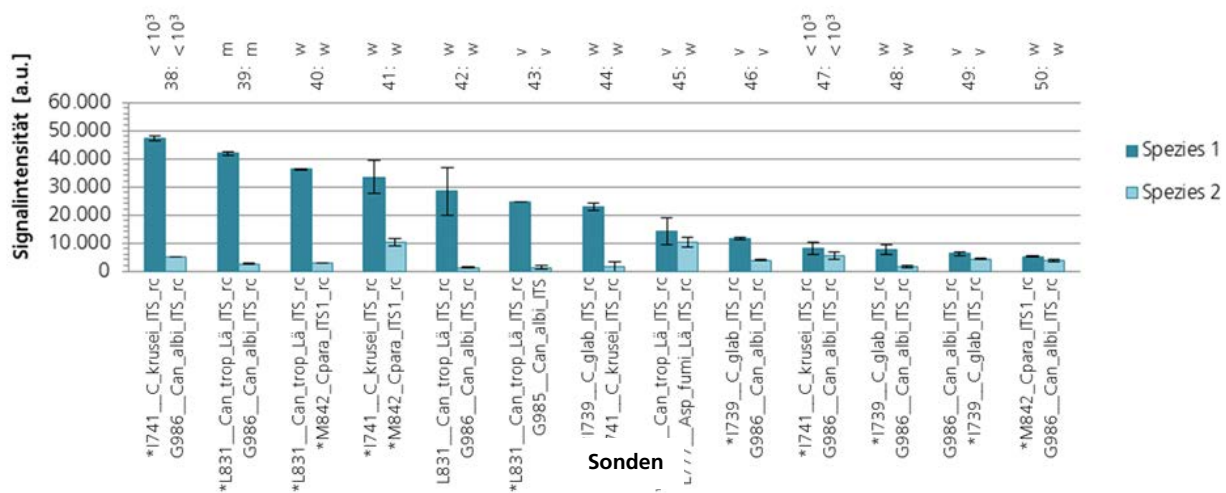


Abbildung 39: Signalintensitäten hybridisierter Nested-PCR-Produkte polymikrobieller Patientenproben, deren Befund bestätigt werden konnte. Mit * gekennzeichnete Sonden zeigen die speziesspezifische Identifizierung von Nicht-*albicans* *Candida* Spezies. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung (n=2). Die Angaben des mikrobiologischen Befundes bezüglich der KBE/ml sind oberhalb dargestellt: mäßig (m), wenig (w), vereinzelt (v).

Drei Proben zeigten auf dem Array Signale für je drei Spezies. Das geringste gemittelte Signal hatte eine Intensität von 1.257 a.u. und ging von der Antisense-Sonde für *C. glabrata* I739__C_glab_ITS_rc aus (Probe 53). Mit einer Intensität knapp über dem Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. kann die Spezies *Candida glabrata* mittels des entwickelten Mikroarrays nachgewiesen werden. Bei der Evaluierung des Arrays mit Referenz-DNA zeigte die Sonden wesentlich höhere Werte um die 20.000 a.u. (vgl. Abbildung 30). Der mikrobiologische Befund gab eine Zellzahl nach Kultivierung von 10^3 KBE/ml für Nicht-*albicans* *Candida* Spezies an. Anhand der Ergebnisse der Coinfektionsversuche ist bei einem DNA-Vorkommen von mehr als einer Spezies das Verhältnis der DNA-Menge zueinander entscheidend für den Nachweis der unterschiedlichen Spezies (vgl. 5.7.3).

Das höchste Signal wurde auf der Antisense-Sonde für *C. tropicalis* L831__Can_trop_Lä_ITS_rc mit einer gemittelten Intensität von 13.940 a.u. beobachtet (Probe 52). Ebenfalls in Probe 52 entsprach die Standardabweichung exakt dem Wert der Signalintensität der zugehörigen *C. parapsilosis*-Antisense-Sonde M842_Cpara_ITS1_rc. Bei der Array-Evaluierung mit Referenz-DNA zeigte die Sonde M842_Cpara_ITS1_rc wesentlich höhere Werte um die 20.000 a.u. (vgl. Abbildung 30). Aufgrund des DNA-Vorkommens von mehr als einer Spezies ist das Verhältnis der DNA-Menge der jeweiligen Spezies zueinander entscheidend (vgl. 5.7.3).

Die Sense-Sonde für *C. albicans* G985__Can_albi_ITS in Probe 53 zeigte eine gemittelte Intensität von 1.650 a.u. und eine zugehörige Standardabweichung von 1.043 a.u. (vgl. Abbildung 40), sodass die DNA dieser Spezies lediglich in einem der beiden Replikate nachgewiesen werden konnte. Wie in Probe 52

scheint hier das Verhältnis der DNA-Mengen der unterschiedlichen Spezies zueinander eine Rolle zu spielen. Zudem zeigte die Sonde für *Candida albicans* selbst bei höheren DNA-Mengen bei der Evaluierung mit Referenz-DNA nur geringe Intensitätswerte (vgl. Abbildung 30).

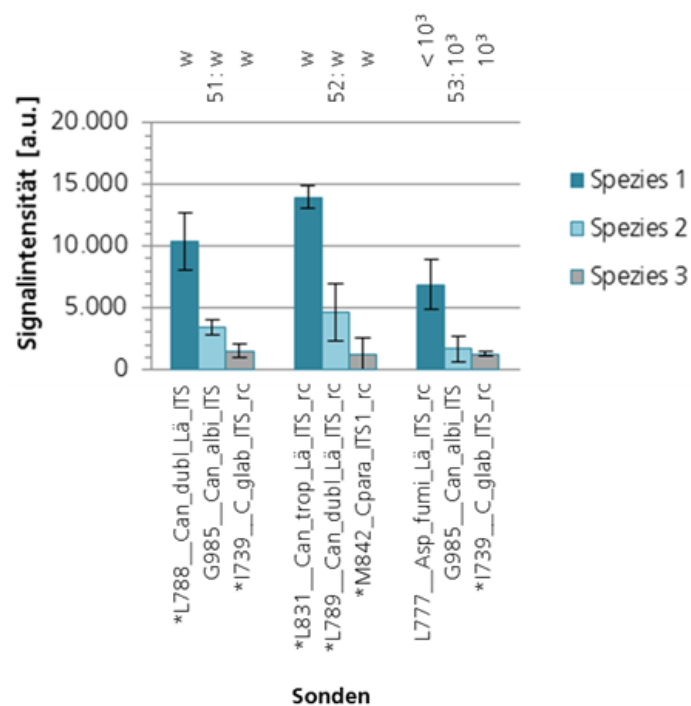


Abbildung 40: Signalintensitäten hybridisierter *Nested-PCR*-Produkte polymikrobieller Patientenproben mit mehr als zwei identifizierten Spezies, deren Befund bestätigt werden konnte. Mit * gekennzeichnete Sonden zeigen die speziesspezifische Identifizierung von *Nicht-albicans Candida* Spezies. Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung (n=2). Die Angaben des mikrobiologischen Befundes bezüglich der KBE/ml sind oberhalb dargestellt.

5.8.2.1 Erweiterung des mikrobiologischen Befunds durch Identifizierung weiterer Spezies

Die Ergebnisse der Hybridisierung von 23 weiteren Patientenproben stimmten mit den Ergebnissen des mikrobiologischen Befunds überein ergaben aber weitere Signale auf dem Mikroarray, die zusätzlichen Spezies zugeordnet werden konnten. Somit konnte der mikrobiologische Befund durch Mikroarray-System erweitert werden. Eine genauere Identifizierung von Nicht-*albicans Candida* Spezies konnte ebenfalls erbracht werden; es handelte sich um Signale auf Sonden für: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* (vgl. Tabelle 43).

Tabelle 43: Mittels Mikroarray konnten mehr Spezies identifiziert werden als mittels mikrobiologischer Methoden. Gezeigt sind die Patientenproben Trachealsekret (TS) oder Bronchoalveoläre Lavage (BAL), der Mikrobiologische und Array-Befund sowie ein Vergleich dieser. Der Befund konnte bestätigt werden (✓). Nicht-*albicans Candida* Spezies (NAC spp.) konnten mittels Mikroarray weiter differenziert werden (+) und zudem konnten zusätzliche Spezies identifiziert werden (++)

Probe	Mikrobiologischer Befund	Array-Befund			Vergleich Befunde		
54	TS	<i>C. tropicalis</i> (viel)	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>		✓	++
55	TS	NAC spp. (m)	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>		+	++
56	TS	NAC spp. (w)	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>		+	++
57	TS	<i>A. fumigatus</i> (v)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i>		✓	++
58	TS	NAC spp. (m)	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>		+	++
59	BAL	<i>C. glabrata</i> (<10 ³)	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>		✓	++
60	BAL	<i>C. glabrata</i> (10 ³)	<i>C. glabrata</i>	<i>C. dubliniensis</i>		✓	++
61	BAL	<i>C. parapsilosis</i> (<10 ³)	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. lusitaniae</i>		✓	++
62	TS	<i>A. fumigatus</i> (w)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i>		✓	++
63	TS	<i>C. albicans</i> (w)	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>		✓	++
64	TS	NAC spp. (w)	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>		+	++
65	BAL	NAC spp. (< 10 ³)	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>		+	++
66	TS	<i>C. albicans</i> (m)	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>		✓	++
67	TS	<i>C. albicans</i> (v)	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>		✓	++
68	TS	<i>C. albicans</i> (w)	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>		✓	++
69	BAL	<i>C. albicans</i> (10 ³)	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>		✓	++
70	BAL	<i>A. fumigatus</i> (10 ³)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>C. albicans</i>	✓	++ ++
71	TS	<i>C. tropicalis</i> (m)	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	✓	++ ++
72	TS	<i>C. albicans</i> (w)	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>A. fumigatus</i>	✓	++ ++
73	TS	<i>C. albicans</i> (w), NAC spp. (w)	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>A. fumigatus</i>	✓	+ ++
74	TS	NAC spp. (w)	<i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>	<i>T. asahii/asteroides</i>		+	+ ++
75	TS	<i>A. fumigatus</i> (m)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>		✓	++
76	BAL	<i>A. fumigatus</i> (v), PCR positiv	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>T. cutaneum/mucoïdes</i>		✓	++

Die aufgetragenen Signalintensitäten der Sonden, die innerhalb einer Patientenprobe auftraten, sind einzeln und nicht vergleichend miteinander zu betrachten (vgl. Abbildung 41). Das geringste Signal zeigte die Antisense-Sonde für *C. glabrata* I739__C_glab_ITS_rc mit einer gemittelten Intensität von 1.071 a.u. Damit erreichte die Sonde Intensitäten, die nur knapp über dem Signal-Schwellenwert von 1.000 a.u. lagen. Das höchste Signal war auf der Antisense-Sonde für *C. tropicalis* L831__Can_trop_Lä_ITS_rc mit einer gemittelten Intensität von 40.699 a.u. festzustellen. Vier Signale waren auf den Sense-Sonden für *C. dubliniensis* L788__Can_dubl_Lä_ITS und *C. albicans* G985__Can_albi_ITS mit Intensitäten von 9.546 a.u. (Probe 60) bzw. 1.459 a.u. (Probe 65), 2.320 a.u. (Probe 69) und 2.842 a.u. (Probe 64) zu beobachten. Alle anderen Signale gingen von Antisense-Sonden aus. Die Standardabweichungen der Sonden I739__C_glab_ITS_rc in Probe 12 und M842__Cpara_ITS1_rc in Probe 16 entsprachen nahezu dem Wert der Signalintensität selbst (vgl. Abbildung 41).

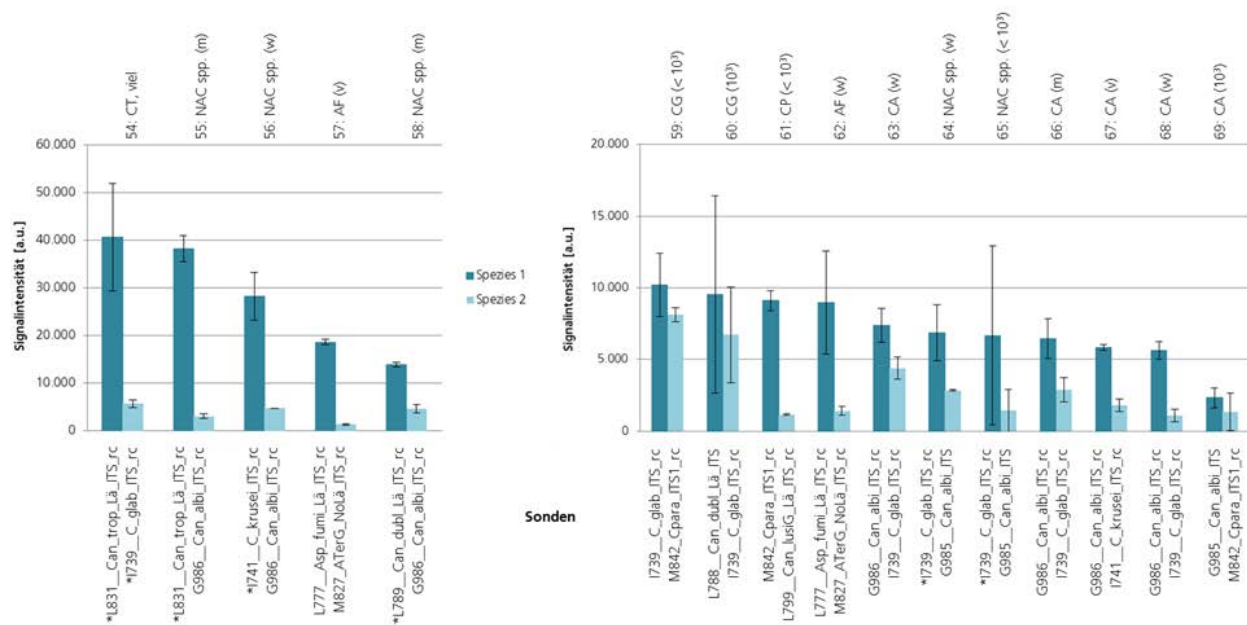


Abbildung 41: Signalintensitäten von Patientenproben, deren mikroarraybasierter Befund weitere Spezies aufzeigt als der mikrobiologische Befund. Die mikrobiologisch identifizierten Spezies der Proben sind oberhalb dargestellt: *A. fumigatus* (AF), *C. tropicalis* (CT), *C. albicans* (CA), Nicht-*albicans* *Candida* Spezies (NAC spp.), *C. parapsilosis* (CP), *C. glabrata* (CG). Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung (n=2). Die Angaben des mikrobiologischen Befundes bezüglich der KBE/ml sind oberhalb dargestellt: mäßig (m), wenig (w), vereinzelt (v). Mit * gekennzeichnete Sonden zeigen die speziespezifische Identifizierung von *Nicht-*albicans* Candida* Spezies.

Neben den in Abbildung 41 betrachteten Patientenproben mit zwei mittels Mikroarray identifizierten Spezies, waren in sieben Patientenproben Signale für mindestens drei Spezies festzustellen. Wurde mittels mikrobiologischer Methoden am HDZ lediglich eine Spezies identifiziert, *Aspergillus fumigatus* oder *Candida* spp. waren auf dem Array Signale für diese und weitere Spezies dieser Gattungen festzustellen. Der Mikroarray bestätigte in allen Fällen das Vorkommen von DNA der Spezies *Aspergillus fumigatus*. In diesen Fällen waren anhand des Array-Systems zusätzliche Signale für eine weitere *Aspergillus* spp. festzustellen: *A. terreus*. Zudem zeigte der Mikroarray Signale für *Trichosporon* Spezies, die anhand mikrobiologischer Methoden nicht identifiziert wurden. In sieben Fällen wurden anhand mikrobiologischer Methoden Nicht-*albicans Candida* Spezies nachgewiesen. Mittels des entwickelten Arrays war in diesen Fällen eine spezies-spezifische Identifizierung möglich.

Das geringste Signal war auf der Antisense-Sonde für *A. terreus* M827_ATerG_NoLä ITS_rc mit einer gemittelten Intensität von 1.071 a.u. festzustellen. Mit dieser geringen Intensität befand sich die Sonde nur knapp über dem empirischen Signal-Schwellenwert von 1.000 a.u. Bei der Evaluierung des Arrays mit 3 ng Referenz-DNA waren für *A. terreus* Signale mit einer Intensität von 47.218 a.u. festzustellen (vgl. 5.7.2.2). Da es sich bei diesen Proben um polymikrobielle Proben handelte, lagen DNA-Moleküle mehrerer Spezies vor. Somit spielt das Verhältnis der DNA-Mengen der Erreger zueinander für den molekularen Nachweis mittels des entwickelten Array eine wichtige Rolle (vgl. 5.7.3). Das höchste gemittelte Signal wurde auf der Antisense-Sonden für *C. tropicalis* L831__Can_trop_Lä ITS_rc mit einer Intensität von 39.248 a.u.

festgestellt. Lediglich vier Sonden zeigten Signale auf den zugehörigen Sense-Sonden: L776__Asp_fumi_Lä ITS, G985__Can_albi ITS, I738__C_glab ITS innerhalb der Probe 75 und G985__Can_albi ITS aus Probe 76. Da sowohl von Sense- als auch Antisense-Sonden Signale ausgingen, ist das Spotten beider Sondenkonfigurationen notwendig, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden (vgl. 6.3). Die aufgetragenen Signalintensitäten der Sonden, die innerhalb einer Patientenprobe auftraten, sind einzeln und nicht vergleichend miteinander zu betrachten (vgl. Abbildung 42).

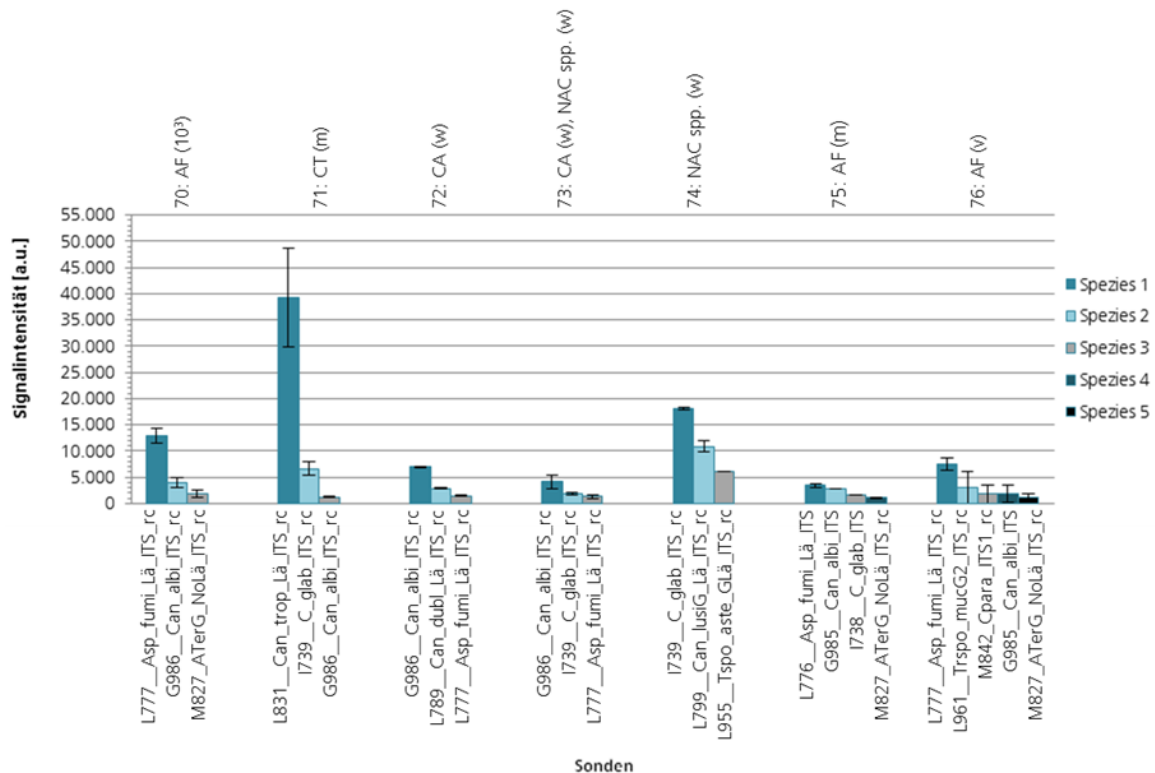


Abbildung 42: Signalintensitäten von Patientenproben, deren mikroarraybasierter Befund weitere Spezies aufzeigt. Die mikrobiologisch identifizierten Spezies der Proben sind oberhalb dargestellt: *A. fumigatus* (AF), *C. tropicalis* (CT), *C. albicans* (CA). Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung (n=2). Die Angaben des mikrobiologischen Befundes bezüglich identifizierter Spezies und KBE/ml sind oberhalb dargestellt: mäßig (m), wenig (w), vereinzelt (v). Mit * gekennzeichnete Sonden zeigen die speziesspezifische Identifizierung von *Nicht-albicans Candida* Spezies. A: Der mikrobiologische Befund identifizierte eine bzw. zwei Spezies; es konnten Signale für drei Spezies auf dem Array festgestellt werden. B: Der mikrobiologische Befund identifizierte eine Spezies; es konnten Signale für mindestens drei Spezies auf dem Array festgestellt werden.

5.8.3 Teilweise Erfassung der Pathogene mittels DNA-Mikroarray

Anhand mikrobiologischer Methoden konnten in 23 Patientenproben je zwei oder mehr Spezies identifiziert werden. Wurden die PCR-Produkte der zweiten *Nested-PCR* dieser Proben hybridisiert, zeigten sich Signale die den mikrobiologischen Befund einer oder mehrere Spezies bestätigen konnten. Es konnten jedoch nicht für alle Spezies, die mikrobiologisch identifiziert wurden, Signale auf dem Mikroarray zugeordnet werden (vgl. Tabelle 44). Die Ergebnisse der Coinfektionsversuche zeigten, dass DNA eines sekundären Erregers mindestens in einem Verhältnis von 1:10 zur DNA des primären Erregers vorliegen muss, um Signale für beide Erreger detektieren zu können (vgl. 5.7.3).

Tabelle 44: Mittels Mikroarray konnten weniger Spezies identifiziert werden als mittels mikrobiologischer Methoden. Gezeigt sind die Patientenproben Trachealsekret (TS) oder Bronchoalveoläre Lavage (BAL), der Mikrobiologische und Array-Befund sowie ein Vergleich dieser. Der Befund konnte bestätigt werden (✓). Nicht-*albicans Candida* Spezies (NAC spp.) konnten mittels Mikroarray weiter differenziert werden (+), Spezies zeigten keine Signale auf dem Mikroarray (-), Array identifizierte andere Spezies (X).

Probe		Mikrobiologischer Befund			Array-Befund		Vergleich Befunde		
77	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (m)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
78	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
79	BAL	<i>C. albicans</i> (10 ⁴)	NAC spp. (10 ⁴)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
80	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
81	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
82	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (w)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
83	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
84	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
85	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (w)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
86	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
87	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (m)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
88	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
89	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (m)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
90	BAL	<i>C. albicans</i> (10 ⁴)	NAC spp. (10 ⁴)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
91	TS	<i>C. albicans</i> (w)	<i>C. glabrata</i> (m)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
92	TS	<i>C. albicans</i> (v)	<i>C. tropicalis</i> (m)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
93	TS	<i>C. albicans</i> (v)	<i>A. fumigatus</i> (v)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
94	TS	NAC spp. (v)	<i>C. albicans</i> (v)		<i>C. albicans</i>		✓	-	
95	BAL	NAC spp. (10 ³)	<i>C. albicans</i> (< 10 ³)		<i>C. metapsilosis</i> <i>C. orthopsilosis</i>		+	-	
96	TS	NAC spp.(m)	<i>C. tropicalis</i> (m)	<i>C. albicans</i> (v)	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	+	✓	-
97	TS	NAC spp. (w)	<i>C. albicans</i> (w)		<i>C. dubliniensis</i> <i>C. glabrata</i>		+	-	
98	BAL	<i>C. albicans</i> (< 10 ³)	<i>A. fumigatus</i> (< 10 ³)	NAC spp. (< 10 ³)	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	✓	✓	-
99	TS	<i>C. albicans</i> (< 10 ³)	<i>C. glabrata</i> (< 10 ³)		<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	+	X	

Betrachtet werden die Ergebnisse der hybridisierten Patientenproben, die nur eine (Probe 77-95) bzw. zwei (Probe 96-99) über mikrobiologische Methoden diagnostizierte Spezies bestätigen konnten. Es wurden Signalintensitäten von 1.670 a.u. auf der Antisense-Sonde für *C. albicans* G986__Can_albi_ITS_rc (Probe 95) bis zu 24.646 a.u. auf der Antisense-Sonde für *C. tropicalis* L831__Can_trop_Lä_ITS_rc (Probe 96) festgestellt. Die Signal der *C. albicans* Sonde zeigten bei der Evaluierung mit 3 ng Referenz-DNA auch geringe Intensitätswerte (vgl. Abbildung 30).

Bis auf zwei Ausnahmen konnten alle Signale auf den Antisense-Sonden beobachtet werden: In Probe 94 kam das Signal auf der Sense-Sonde I738__C_glab ITS für *C. glabrata* und in Probe 98 auf der Sense-Sonde G985__Can_albi ITS für *C. albicans*. Die Werte der Standardabweichung in diesen beiden Fällen entsprach nahezu den Werten der gemittelten Signalintensitäten (vgl. Abbildung 43). Demnach waren nur in einem der beiden Replikate Signalintensitäten über 1.000 a.u festzustellen. Bei polymikrobiellen Proben ist das Verhältnis der DNA-Molekülmenge der verschiedenen Erreger für einen parallelen Nachweis der einzelnen Spezies entscheidend (vgl. 5.7.3)

Probe 99 wies den mikrobiologischen Befund einer Infektion mit *Candida albicans* und *Candida glabrata* auf. Auf dem Mikroarray konnten Signale auf zwei Antisense-Sonden detektiert werden: Die Signale auf der Sonde G986__Can_albi ITS_rc bestätigten den mikrobiologischen Befund, wohingegen die Signale auf der Sonde L789__Can_dubl_Lä ITS_rc der Spezies *C. dubliniensis* und nicht *C. glabrata* zuzuordnen waren.

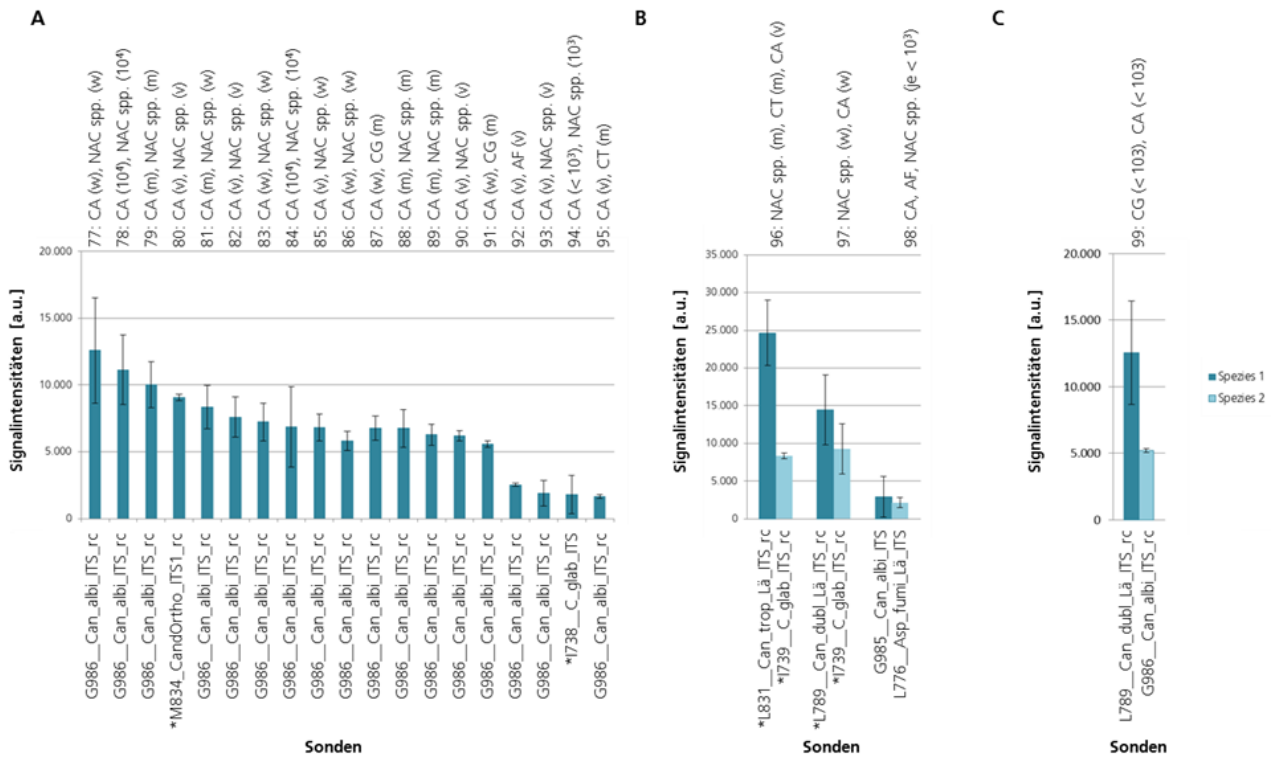


Abbildung 43: Signalintensitäten von Patientenproben, deren mikroarraybasierter Befund nur teilweise bestätigt werden konnte. Die mikrobiologisch identifizierten Spezies der Proben sind oberhalb dargestellt: A. fumigatus (AF), C. tropicalis (CT), C. albicans (CA), C. glabrata (CG). Gezeigt sind die gemittelten Signalintensitäten der Duplikate und die zugehörige Standardabweichung (n=2). Die Angaben des mikrobiologischen Befundes bezüglich identifizierter Spezies und KBE/ml sind oberhalb dargestellt: mäßig (m), wenig (w), vereinzelt (v). Mit * gekennzeichnete Sonden zeigen die speziesspezifische Identifizierung von Nicht-albicans Candida Spezies. A: Der mikrobiologische Befund wies zwei Spezies nach; es konnten nur Signale für eine Spezies auf dem Array festgestellt werden. B: Der mikrobiologische Befund wies mindestens Spezies nach; es konnten nur Signale für zwei Spezies auf dem Array festgestellt werden. C: Der mikrobiologische Befund einer Spezies konnte bestätigt werden, eine andere Spezies nicht; dafür konnten Signale für eine andere Spezies festgestellt werden.

5.8.4 Abweichende Resultate von Array-basierter und mikrobiologischer Identifizierung

Drei von 102 mittels Mikroarray untersuchten Patientenproben zeigten gänzlich abweichende Resultate zu den mikrobiologischen Befunden. Dabei zeigte der Array bei zwei Proben Signale auf Sonden für andere Spezies (Probe 100 und 101) und in einem Fall (Probe 102) konnten keine Signale auf dem Mikroarray detektiert werden; laut mikrobiologischem Befund konnte in dieser Probe eine Infektion mit *C. tropicalis* festgestellt werden (vgl. Abbildung 44).

Probe		Mikrobiologischer Befund	Array-Befund	
100	BAL	NAC spp. ($< 10^3$)	<i>A. fumigatus</i>	
101	TS	NAC spp. (v)	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>
102	TS	<i>C. tropicalis</i> (w)	Keine Signale	

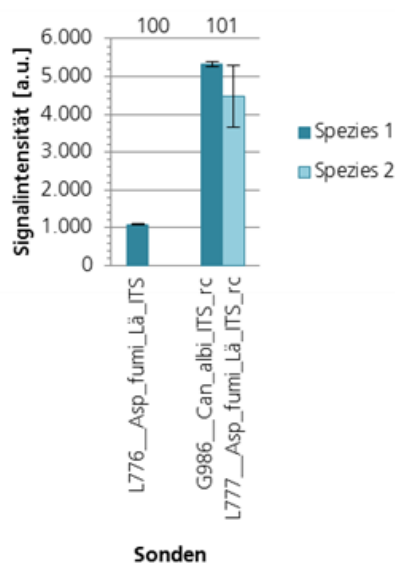


Abbildung 44: Abweichende Resultate von mikrobiologischem Befund und Array-Befund. Oben: Gezeigt sind die Patientenproben Trachealsekret (TS) oder Bronchoalveoläre Lavage (BAL), der Mikrobiologische und Array-Befund. Unten: Gezeigt sind die gemittelten Intensitäten der Sonden signale der Patientenproben 10^0 und 10^1 und die zugehörige Standardabweichung ($n=2$).

6 Diskussion

Eine rechtzeitige Diagnostik fungaler Spezies in der Klinik ist essentiell, da diese völlig anders therapiert werden müssen als bspw. bakterielle Pathogene. Je nach Patientenprobe und Schwere der Infektion schwanken die Zellzahlen der pathogenen Pilze in den Proben sehr. Um eine systemische fungale Infektion möglichst frühzeitig zu erkennen, sollten möglichst geringe Zellzahlen unter zehn Zellen nachgewiesen werden können. Gegenwärtig werden die Patientenproben zeitaufwändig kultiviert, um die Zellzahl zu erhöhen bzw. um lebensfähige Erreger nachweisen zu können. Konventionell zum Einsatz kommen zudem morphologische und physiologische Tests, die jedoch alle sehr zeitaufwendig sind. Eine Identifizierung der infektionsverursachenden fungalen Erreger ist oftmals erst nach Tagen oder Wochen möglich. Während die Identifizierung von *Candida albicans* im besten Fall einige Stunden benötigt, kann die Identifizierung von Nicht-*albicans Candida* Spezies bis zu 72 Stunden beanspruchen (Coignard *et al.*, 2004). Die Identifizierung und Diskriminierung von *Aspergillus* Spezies anhand makro- und mikromorphologischen Merkmalen kann sogar Wochen erfordern (Healy *et al.*, 2004). Für die Beurteilung morphologischer Strukturen stellt dabei eine entsprechende Expertise die Grundvoraussetzung dar (Chen *et al.*, 2000).

Liegt eine *Candida*-Infektion des Blutkreislaufes vor, kann sich aufgrund der verzögerten adäquaten antifungalen Therapie die Mortalitätsrate der Patienten während der Kultivierungsdauer der Blutprobe beträchtlich erhöhen. Bei einem verzögerten Therapiebeginn von unter 24 Stunden auf bis zu 48 Stunden nimmt die Sterberate der Patienten um 42,7 % zu (Morrell *et al.*, 2005). Bei konventionellen morphologischen und physiologischen Methoden können zudem inkorrekte Klassifizierungen und Identifizierungen auftreten (Chen *et al.*, 2001). Während der Dauer der Kultivierung wird oftmals eine empirische Therapie eingeleitet, um den Gesundheitszustand des Patienten zu verbessern. Diese Verdachtstherapie kann einerseits unwirksam sein, wenn der Erreger bspw. resistent gegen das verabreichte Antimykotikum ist. Andererseits fördert eine Gabe von ggf. unwirksamen Antimykotika die Entwicklung von Resistenzen und unerwünschten Nebenwirkungen (Fernandez *et al.*, 2009).

Um eine adäquate Therapie in möglichst kurzer Zeit einleiten zu können, ist eine schnelle spezifische und sensitive Methode von Nöten, die es erlaubt, selbst geringe Zellzahlen des Pathogens nachzuweisen. Je früher eine Infektion erkannt wird, desto höher sind die Überlebenschancen des Patienten. DNA-Mikroarray-Analysen bringen den Vorteil einer simultanen Identifizierung vieler DNA-Moleküle mit sich (Bodrossy und Sessitsch, 2004). In Kombination mit sensitiven PCR-Methoden, wie der *Nested-PCR*, die eine Amplifikation selbst geringer DNA-Molekülmengen ermöglicht (Jaeger *et al.*, 2000), kann die zeitintensive Kultivierung der Patientenprobe entfallen. Als Template für die *Nested-PCR* zur Amplifikation fungaler Zielsequenzen dient isolierte DNA direkt aus den Patientenproben.

6.1 *Internal transcribed spacer*-Region als Identifizierungsgrundlage

Für eine eindeutige Identifizierung und Diskriminierung von 56 Hefe- und Schimmelpilzspezies mittels DNA-Mikroarray-Analyse zeigte sich die *Internal transcribed spacer*-Region des ribosomalen Clusters als geeignete Zielsequenz. Die Evolutionsrate ist sehr hoch verglichen mit weiteren Genen des ribosomalen Clusters (White *et al.*, 1990) oder anderen untersuchten Genen wie Calmodulin, β -Tubulin oder Elongationsfaktor-3. Insertionen oder Deletionen von einzelnen Nukleotiden oder Sequenzbereichen sind verantwortlich für die unterschiedliche Länge und hohe Variabilität der ITS-Region bei Pilzen. Diese Sequenzunterschiede innerhalb der Spacer ITS1 und ITS2 erlauben damit eine Diskriminierung der 56 fungalen Spezies. Für die Identifizierung einer sehr hohen Anzahl verschiedener Spezies, wie es in dieser Arbeit der Fall ist, ist diese hohe Variabilität notwendig. Zudem ist die Sequenzverfügbarkeit der ITS-Region in der öffentlich zugänglichen Datenbank NCBI verglichen mit anderen Genen inner- und außerhalb des ribosomalen Clusters sehr gut und erlaubt eine gute *in silico*-Aussagekraft über die entwickelten Oligonukleotid-Sonden. Für die Identifizierung von 56 verschiedenen Pilzspezies wurden aus 380 Sonden, die auf der *Internal transcribed spacer*-Region des ribosomalen Clusters basieren, 96 ITS-Sonden final ausgewählt.

6.2 Etablierung und Vergleich unterschiedlicher PCR-Methoden

Für die Untersuchung der 96 ITS-Sonden wurde DNA von Referenzspezies mittels verschiedener PCR-Methoden amplifiziert und die PCR-Produkte auf alle Sonden hybridisiert. Es wurden die PCR-Methoden *Single*- und *Multiplex-PCR* sowie die Methode der *Nested-PCR* durchgeführt und die Hybridisierungsergebnisse miteinander verglichen. Die Hybridisierung der Produkte der *Multiplex-PCR* (vgl. 5.5.3) zeigte oft hohe spezifische Signale auf dem Mikroarray, jedoch waren ebenfalls viele unspezifische Signale mit hohen Intensitätswerten zu verzeichnen (vgl. Tabelle 26). Durch die gleichzeitige Verwendung der zwei Primerpaare ITS 1+2 und ITS 3+4 waren drei Hauptprodukte mittels PCR entstanden, die durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden konnten (Daten nicht gezeigt). Bei den Produkten handelte es sich sehr wahrscheinlich um Sequenzen des ITS-Spacers 1 und des ITS-Spacers 2 sowie der gesamten ITS-Region. Dies konnte aus der Lage der ITS-Primer innerhalb des ribosomalen Clusters (vgl. Abbildung 10), durch die *in silico* ermittelten Produktgrößen der jeweiligen Primerpaare und Vergleich der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produktgrößen geschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für die hohen Signalintensitätswerte, die nach Hybridisierung der *Multiplex-PCR*-Produkte festgestellt werden konnten, könnten die Sequenzen der Primer ITS 2 und ITS 3 liefern. Die Sequenzen stellen das reverse Komplement zueinander dar wodurch auch die Anfangs- bzw. Endsequenzen der *Multiplex-PCR*-Produkte revers komplementär zueinander sind. Eine Vermutung wäre, dass partielle Denaturierungen der PCR-Produkte während der Hybridisierung stattgefunden haben sowie einzelsträngige Sequenzen entstanden sein könnten (vgl. 6.3), sodass sich die umgekehrt gegenläufigen Sequenzen aneinander lagern konnten. Da jedes PCR-Produkt durch die Cy3-markierten Primer fluoresziert, könnte sich die Fluoreszenz durch diesen Anlagerungseffekt erhöhen und die hohen spezifischen Signalintensitäten erklären. Allerdings könnten auch unspezifische Signale die Folge dieser PCR-Produkte sein. Für die *Multiplex-PCR* konnte anhand der Richtig-Positiv-Rate

deshalb nur eine 62 %-ige Wahrscheinlichkeit ermittelt werden, d.h. dass die DNA der Spezies richtig identifiziert wurde (vgl. Tabelle 27).

Im Vergleich zu der Richtig-Positiv-Rate, die für die *Multiplex-PCR* ermittelt werden konnte, lag die RP-Rate für die *Singleplex-PCR* zur Amplifikation der gesamten ITS-Region durch das Primerpaar ITS 1+4 bei 94 %. Demnach konnte die DNA der jeweiligen Spezies zu 94 % richtig identifiziert werden (vgl. Tabelle 27). Allerdings wiesen die spezifischen SONDENSIGNALE verglichen mit den Intensitätswerten, die durch die anderen PCR-Methoden ermittelt werden konnten, lediglich mittlere Intensitätswerte auf (vgl. 5.5.3). Die *Singleplex-PCR* mit den Primerpaaren ITS 1+2 oder ITS 3+4 wies nahezu die gleiche Anzahl an hohen spezifischen Signalen auf, wie es durch Hybridisierung der Produkte der *Multiplex-PCR* der Fall war. Hier konnte die höchste Wahrscheinlichkeit der korrekten Identifizierung ermittelt werden, da die RP-Rate dieser Methode bei 96 % lag (vgl. Tabelle 27). Möglicherweise war dies auf die kurzen PCR-Produkte, die durch diese Primerpaare entstehen, zurückzuführen. Kurze PCR-Produkte führten oftmals zu besseren Signalintensitäten, möglicherweise durch die geringere Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Sekundärstrukturen, die sich negativ auf die Zusammenlagerung von PCR-Produkt und Sonde auswirken können. Durch die getrennte Amplifizierung und Hybridisierung der einzelnen PCR-Produkte konnte eine Kreuzreaktion der Sequenzen während der PCR oder der Hybridisierung und möglicherweise dadurch die hohe Zahl unspezifischer Signale verhindert werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die getrennte Amplifizierung der beiden ITS-Spacer 1 und 2 durch die Primerpaare ITS 1+2 und ITS 3+4 die besten Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität des *PCR-Array-Systems* lieferte. Hinsichtlich einer klinischen Anwendung des Mikroarrays würde dies bedeuten, dass eine Patientenprobe durch zwei *Singleplex-PCR* einerseits durch das Primerpaar ITS 1+2 andererseits anhand des Primerpaars ITS 3+4 überprüft werden müsste. Da die Zellzahl der Erreger in Patientenproben sehr gering sein kann, könnte sich eine Aufteilung der Probe bei sehr geringen Zellzahlen nachteilig auswirken und womöglich zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

6.3 Sensitivität und Spezifität des entwickelten *PCR-Array-System*

6.3.1 ITS-Nested-PCR

Da für die Methode der *Nested-PCR* bereits hohe Sensitivitäten anhand von Patientenproben gezeigt werden konnten (Jaeger *et al.*, 2000), wurde das ITS-Primersystem für die Anwendung als *Nested-PCR* angepasst und die Sensitivität dieser etablierten ITS-*Nested-PCR* mit seriellen DNA-Verdünnungsreihen getestet. Die erste PCR der *Nested-PCR* entspricht einer klassischen *Singleplex-PCR*. Diese werden auch in der klinischen Diagnostik eingesetzt (Loeffler *et al.*, 1999). In dieser Arbeit konnten lediglich bei DNA-Template-Mengen in der Größenordnung von 10^3 bis 10^4 DNA-Molekülen PCR-Produkte anhand gelelektrophoretischer Auftrennung festgestellt werden (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 22). Diese DNA-Menge ist je nach Probenmaterial nicht gegeben und kann nur weiterfortgeschrittene Infektionen detektieren. Patientenproben mit geringer Pathogenlast würden unter dem Detektionsschwellenwert der PCR-Array-Analyse liegen, was in einer falsch-negativ-Diagnose resultieren würde. Die hohe Sensitivität einer *Nested-PCR* erlaubt jedoch die Amplifikation von mindestens zehn DNA-Molekülen. Durch den in dieser Arbeit entwickelten *PCR-Array-System*s ist zudem eine, sich an die *Nested-PCR* anschließende, simultane Überprüfung der Patientenprobe auf 56 humanpathogene Pilze innerhalb von nur wenigen Stunden möglich. Die DNA-Isolierung der Patientenprobe benötigt ca. eine Stunde; gegebenenfalls ist eine Vorbehandlung mittels Chitinasen oder *MagNA Lyser Instrument* (Roche) notwendig (Quelle Dr. Knabbe, Dr. Weile, HDZ). Die Amplifikation der Zielregionen über die *Nested-PCR* beansprucht ca. drei Stunden und die simultane Überprüfung der Probe durch den Mikroarray dauert ca. eineinhalb Stunden.

6.3.2 Sensitivität des *PCR-Array-System*s

Die erste PCR der *Nested-PCR* findet durch das Primerpaar ITS 1+4 statt, welches die gesamte ITS-Region amplifiziert. Die zweite PCR amplifiziert entweder ITS-Spacer 1 oder ITS-Spacer 2 durch die Primerpaare ITS 1+2 oder ITS 3+4. Die Hybridisierung dieser PCR-Produkte auf dem Mikroarray zeigte eine geringe Sensitivität. Im Fall von *C. parapsilosis* und *C. glabrata* waren die eingesetzten DNA-Mengen für eine Amplifikation mittels *Singleplex-PCR* nicht ausreichend, es konnten weder Produkte auf dem Agarosegel noch Signale auf dem Mikroarray festgestellt werden. Bei den Spezies *C. tropicalis* und *A. fumigatus* waren nur bei der höchsten getesteten DNA-Menge von 10^5 Molekülen Signale auf dem Mikroarray festzustellen, während die Sensitivität der PCR bei *A. terreus*, *C. krusei*, *A. flavus* und *C. albicans* höher war und 10^4 Moleküle noch zu Signalen auf dem Array führten, was jedoch noch zu wenig sensitiv für eine klinische Diagnostik ist. Aufbauend auf den Ergebnissen der ersten PCR konnte mit der zweiten PCR eine sehr hohe Sensitivität erzielt werden. Es konnten mindestens zehn DNA-Moleküle bei nahezu allen untersuchten Spezies zuverlässig nachgewiesen werden, zum Teil auch geringere Mengen. Die Standardabweichungen bei einem DNA-Molekül waren oft verhältnismäßig hoch, sodass das Ergebnis der *Nested-PCR* bei diesen geringen DNA-Mengen nicht mehr zuverlässig war. Grund dafür ist wahrscheinlich die ungleiche Verteilung einzelner DNA-Moleküle in individuellen Probengefäßen. Patientenproben mit geringer Patho-

genlast, die ca. zehn DNA-Moleküle beinhalten, können somit durch die gestaffelte Amplifikation in der *Nested-PCR* zuverlässig nachgewiesen werden.

6.3.3 Evaluierung und Spezifität des *PCR-Array-Systems*

Die Evaluierung des *PCR-Array-Systems* wurde zum einen mit Referenz-DNA der 55 Pilzspezies in Anwesenheit humaner DNA durchgeführt. Dabei konnten 35 Spezies eindeutig nachgewiesen werden. Die Hybridisierung von weiteren 20 Spezies führte zu spezifischen und niedrigen unspezifischen Signalen. Die unspezifischen SONDENSIGNALE lagen dabei nahe des Detektionsschwellenwertes von 1.000 a.u. und zeigten in der Regel Intensitätswerte, die unter 20 % des Intensitätswerts des spezifischen Signals lagen (vgl. Abbildung 34). Weiterhin wurde das *PCR-Array-System* mit DNA aus 102 respiratorischen Patientenproben evaluiert. Der empirisch ermittelte Detektionsschwellenwert des etablierten DNA-Mikroarrays von 1.000 a.u. konnte durch Hybridisierungen der Patientenproben als geeigneter Schwellenwert für die Positiv-Negativ-Unterscheidung bestätigt werden. Die Sonden für die Spezies *Candida albicans* beispielsweise zeigte in Evaluierungsexperimenten selbst bei hohen DNA-Mengen geringe Intensitäten. *Candida albicans* stellt die klinisch relevanteste Hefespezies dar und auch die Mehrzahl der Patientenproben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wiesen *C. albicans* als Ursache mono- als auch polymikrobieller Infektionen auf. Trotz relativ geringer Fluoreszenzsignale konnte die Spezies in den Patientenproben eindeutig und deutlich über dem empirisch ermittelten Schwellenwert identifiziert werden. Ein höherer Schwellenwert von bspw. 2.000 a.u. hätte dazu geführt, dass einige mikrobiologischen *C. albicans*-Befunde anhand des etablierten *PCR-Array-Systems* nicht hätten bestätigt werden können.

Die Spezifität des etablierten *PCR-Array-Systems* beruht ausschließlich auf der Diskriminierungsfähigkeit der entwickelten ITS-Sonden. Untersucht wurde die Spezifität des Systems anhand von Referenz-DNA von 55 Pilzspezies jeweils mit humanem DNA-Hintergrund. Davon zeigten 21 Sonden ausschließlich spezifische Signale für die jeweilige Spezies (vgl. Abbildung 30). Darunter waren drei Sonden, die mehr als eine Spezies abdecken: M866_CrypG+N ITS2_Lä_rc, L955_Tspo_aste_GLä ITS_rc, L961_Trspo_mucG2 ITS_rc (vgl. Abbildung 28). Neun Sonden zeigten spezifische Signale für die jeweilige hybridisierte Spezies, allerdings traten diese Sonden zudem als unspezifisches Signal mit Intensitäten über 1.000 a.u. bei Hybridisierungen der *Nested-PCR*-Produkte anderer Spezies auf (vgl. Abbildung 31). 19 Sonden zeigten bei der Hybridisierung der *Nested-PCR*-Produkte von 20 Spezies (eine gemeinsame Sonde für *Mucor pusillus/racemosus*) spezifische Signale (vgl. Abbildung 32) sowie unspezifische Signale über 1.000 a.u. auf Sonden, die nicht für die hybridisierte Spezies entwickelt wurden (Abbildung 33). Eine Klassifizierung der Signale in Richtig-Positive (RP), Falsch-Negative (FN), Richtig-Negative (RN) und Falsch-Positive (FP) Signale, erfolgte anhand der Ergebnisse von Einzelspezies-Hybridisierungen, die in einer Spezifitäts-Matrix dargestellt wurden (vgl. Abbildung 29). Als RN-Signale wurden alle SONDENSIGNALE der Matrix gewertet, die Intensitäten unter dem Detektionsschwellenwert von 1.000 a.u. aufwiesen und von Sonden ausgingen, die nicht für die hybridisierte Spezies entwickelt wurden. In Summe handelte es sich um eine hohe Anzahl RN-Signale. Die verwendeten panfungalen ITS-Primer amplifizierten ausschließlich fungale

DNA. Bakterielle DNA, die neben fungaler DNA in den untersuchten Patientenproben enthalten war, wurde nicht amplifiziert bzw. führte nicht zu Signalen auf dem Mikroarray. Ebenso verhielt es sich mit HeLa-DNA. Demnach ist die vorgenommene Klassifizierung der RN-Signale zutreffend.

Negativkontrollen, die auf Patientenproben mit negativem mikrobiologischen Befund beruhten, wurden nicht amplifiziert und hybridisiert, da in einem ersten Schritt die Vergleichbarkeit des mikrobiologischen mit dem durch den Array gegebenen Befunds evaluiert werden sollte. Da anhand eines negativen mikrobiologischen Befundes von einer negativen Patientenprobe auszugehen wäre, würden diese Signale möglicherweise als falsch-positive Signale beurteilt werden.

Für das entwickelte *PCR-Array-System* konnte - bei der Evaluierung von Referenz-DNA einzelner Spezies bei humaner DNA-Last - eine Richtig-Positiv-Rate von 100% ermittelt werden. Das bedeutet die Hybridisierung der Einzelspezies-DNA führte in jedem Fall zu einer korrekten Identifizierung. Um die richtig-positiven Signale in Bezug zu der Gesamtheit der ermittelten Signale über 1.000 a.u. beurteilen zu können, wurde der Positive Vorhersagewert berechnet: die RP-Signale konnten in 65 % korrekt positiv klassifiziert werden (vgl. Tabelle 40). Unspezifische Signale liegen in der zu hohen Ähnlichkeit entwickelter Sonden begründet, die aufgrund der hohen Zahl an Spezies (55 bzw. 56) nicht unterschiedlicher gestaltet werden konnten. Dies brachte Einschränkungen bei der Sondenentwicklung mit sich, wie u.a. den Positionsort der Sonden innerhalb der ITS-Region. Bei *Aspergillus fumigatus* beispielsweise kam lediglich ein einziger Locus für eine speziesspezifische und diskriminierende Sonde in Frage. Andere Positionen innerhalb der ITS-Region würden neben *A. fumigatus* weitere Spezies oder die Spezies selbst inadäquat identifizieren. Doch selbst an dem einzigen in Frage kommenden Locus diskriminiert die Sonde nur über eine einzelne Basenfehlpaarung mittig innerhalb der Sondensequenz. Um die Diskriminierungskraft zu erhöhen, konnte diese nur verlängert werden (vgl. Tabelle 50). Eine Basenfehlpaarung ist das Mindestmaß für eine Diskriminierung und muss sich möglichst mittig innerhalb der Sondensequenz befinden, damit eine Diskriminierung gewährleistet werden kann. Bei der Hybridisierung mit Referenz-DNA zeigte diese *A. fumigatus*-Sonde für die Spezies selbst ausschließlich spezifische Signale (vgl. 5.7.2.2). Allerdings trat die Sonde als unspezifisches Signal bei der Hybridisierung anderer Spezies auf: einerseits waren unspezifische Signale bei der Hybridisierung von entfernt verwandten Spezies festzustellen, andererseits zeigten auch weitere Aspergillen Signale auf den *A. fumigatus*-Sonden. Aufgrund einer spezifischeren Identifizierung wurden für einige Spezies Sonden mit Einschränkungen wie die *Zwei-Sonden-Diskriminierung* entwickelt (vgl. Tabelle 31, Tabelle 32 und 6.3.4). Bei einigen Spezies wäre aufgrund einer identischen Medikation die Entwicklung einer Genus-Sonde denkbar. Diese Spezies mit einer gemeinsamen Sonde abzudecken, war *in silico* jedoch nicht umzusetzen: Es konnte keine Sonden entwickelt werden, die bspw. alle *Aspergillus* Spezies abdeckten und gleichzeitig die verbleibenden 52 Spezies diskriminierten. Dies gilt auch für *Absidia* bzw. *Lichtheimia* spp., *Trichophyton* spp. und *Trichosporon* spp.

6.3.4 Zwei-Sonden-Diskriminierung nah verwandter Spezies

Im Fall einer monomikrobiellen Infektion mit *Aspergillus fumigatus* könnte diese Spezies anhand einer *Zwei-Sonden-Diskriminierung* durch ausschließlich spezifische Signale auf der *A. fumigatus*-Sonde nachgewiesen werden. Würde es sich um eine monomikrobielle *A. flavus*-Infektion handeln, könnte diese ebenfalls eindeutig durch Signale auf den Sonden für *A. flavus* und *A. fumigatus* nachgewiesen werden, da *A. fumigatus* nicht auf der *A. flavus*-Sonde hybridisiert. Bei einer polymikrobiellen Infektion mit *A. flavus* und *A. fumigatus* wäre eine Diskriminierung anhand des finalen *PCR-Array-Systems* allerdings nicht möglich. Bei Annahme monomikrobieller Infektionen würde sich, durch die eindeutige *Zwei-Sonden-Diskriminierung*, die Anzahl der falsch-positiven (FP-) Signale verringern. Dies würde in einem erhöhten Positiven-Vorhersage-Wert (PV-Wert) resultieren (vgl. Tabelle 47). Da die Zahl der beschriebenen polymikrobiellen Infektionen, bei denen mehr als eine fungale Spezies aus derselben Blutkulturflasche isoliert werden konnte, gering ist (Pulimood *et al.*, 2002), wäre eine *Zwei-Sonden-Diskriminierung* ein hilfreiches Mittel für eine schnelle Therapie mit nur geringer Unsicherheit. Unspezifische Signale konnten oft auf Sonden für Spezies festgestellt werden, die zu derselben Medikation der Patienten führen würde. Stützt man sich im Fall der Aspergillen z.B. auf die Veröffentlichung von Tietz und Ruhnke, in welcher die unterschiedlichen *Aspergillus* Spezies unter (*A. fumigatus* und andere) *Aspergillus* spp. zusammengefasst werden (Tietz, 2006, Ruhnke, 2007), können unterschiedliche *Aspergillus* Spezies mit denselben Antimykotika behandelt werden. Eine speziesspezifische Identifizierung wäre in diesem Fall nicht erforderlich.

Tabelle 45: Statistische Betrachtung der *Nested-PCR* ohne und mit Einbeziehung der *Zwei-Sonden-Diskriminierung*. Die Betrachtung bezieht sich ausschließlich auf monomikrobielle Infektionen. Gezeigt ist die Anzahl Richtig-positiver Signale (RP), falsch-positiver Signale (FP), falsch-negativer Signale (FN), richtig-negativer Signale (RN), das prozentuale Ergebnis der Richtig-Positiv-(RP-Rate) und Richtig-Negativ-Rate (RN-Rate) sowie die Ergebnisse des Positiven- (PV-Wert) und Negativen-Vorhersage-Wertes (NV-Wert) der Hybridisierungsergebnisse nach Amplifikation fungaler DNA durch die Protokolle der *Singleplex-PCR* mit den Primerpaaren ITS 1+2 oder ITS 3+4 bzw. ITS 1+4 und der *Multiplex-PCR* mit den Primern ITS 1+2+3+4.

	RP	FP	FN	RN	RP-Rate	RN-Rate	PV-Wert	NV-Wert
<i>Nested-PCR</i> ohne Einbeziehung der <i>Zwei-Sonden-Diskriminierung</i>	110	58	0	5448	100 %	99 %	65 %	100 %
<i>Nested-PCR</i> mit Einbeziehung der <i>Zwei-Sonden-Diskriminierung</i>	110	10	0	5496	100 %	100 %	92 %	100 %

6.3.5 Unspezifische PCR-Produkte und Kontaminationen

Mit einer sehr sensitiven Methode wie der *Nested-PCR* können selbst geringe DNA-Mengen amplifiziert werden. Dabei kann es sich um spezifische Template-DNA-Moleküle aber auch um DNA-Kontaminationen handeln. Dies bedeutet, dass DNA von außen in die Probe eingebracht wurde und zu *spezifischen* Signalen auf dem Mikroarray führte. Sofern Fremd-DNA geeignete Bindestellen für die verwendeten ITS-Primer aufweisen, kann eine Amplifizierung nicht ausgeschlossen werden. Bei den DNA-Sequenzen kann es sich bspw. um Kontaminanten aus Luft wie *Aspergillus*-Sporen, aus der Umgebung oder von Hautoberflächen und verwendeten Materialien handeln. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Versuche für diese Arbeiten nicht unter Reinraumbedingungen oder in Sterilbänken durchgeführt wurden. Ein signifikanter Einfluss z.B. durch Schimmelpilzsporen auf die Ergebnisse konnte nicht gefunden werden.

Bei der Sensitivitätsstudie der *Nested-PCR* waren viele nicht zuordenbare PCR-Produkte auf dem Agarosegel bzw. spezifische Signale auf dem Mikroarray festzustellen (vgl. 5.6). Andere PCR-Methoden wie die *Singleplex-PCR* zeigten keine zu vergleichende Sensitivität - es konnten höchstens 10^4 DNA-Moleküle nachgewiesen werden (vgl. 5.6) – d.h. wesentlich geringere Molekülmengen wie es bei Kontaminationen der Fall ist, wurden nicht amplifiziert und durch Signale auf dem Array festgestellt. Die nicht zuordenbaren *Nested-PCR*-Produkte auf dem Agarosegel waren auf Amplifikationen der HeLa-DNA zurückzuführen (vgl. Abbildung 23), da diese ohne Zugabe von HeLa-DNA nicht beobachtet werden konnten. Die PCR-Effizienz wurde durch die Amplifikation der unerwünschten Sequenzen allerdings nicht negativ beeinflusst: die Bandenstärke der spezifischen Produkte war sehr hoch und vergleichbar mit anderen Versuchen ohne unerwünschte Nebenprodukte, ebenso die Signale auf dem Mikroarray. Die nicht zuordenbare PCR-Produkte der zweiten PCR der *Nested-PCR* waren bei den untersuchten Spezies nur durch die Amplifikation des ITS-Spacers 2 durch das Primerpaar ITS 3+4 festzustellen (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 23). Die Mehrzahl der unerwünschten Produkte, die bei der seriellen DNA-Verdünnungsreihe von *Aspergillus flavus* amplifiziert wurden, hybridisierten beispielsweise nicht mit Sonden des Arrays, sodass keine unspezifischen Signale festzustellen waren. Lediglich bei vereinzelt Verdünnungsstufen waren unerwünschte Signale auf dem Array festzustellen. Da die HeLa-DNA bereits in den Mastermix des Versuches zugegeben wurde, hätten die unspezifischen Array-Signale bei allen Verdünnungsstufen feststellbar sein müssen. Aus diesem Grund handelte es sich bei diesen Einzelfällen sehr wahrscheinlich um vereinzelte Kontaminationen. Zudem zeigten die hohen Werte der Standardabweichungen, dass die kontaminierende DNA häufig in einem der Duplikatsversuche vorlag (vgl. Abbildung 24 und Tabelle 58). Bei den unerwünschten Signalen handelte sich oft um Sonden für *Trichosporon* Spezies, die als Kommensal auf der menschlichen Haut vorkommen (Marier *et al.*, 1978). Neben unerwünschten Signalen bei der Hybridisierung von *A. flavus*-PCR-Produkten waren bei weiteren Spezies ebenfalls vereinzelt unspezifische Signale auf Sonden für *C. glabrata*, *C. albicans* und *Coccidioides immitis/posadasii* festzustellen. Auch die *Candida* Spezies gelten als Kommensale der menschlichen Haut. In einigen Fällen, wie bei der Kontaminante *Coccidioides immitis/posadasii*, handelte es sich wahrscheinlich nicht um DNA des Pilzes per se, sondern um Kreuzhybridisierungen, die zu Signalen führten. Die Spezies *Coccidioides immitis* bzw. *Coccidioides posadasii* kommen in Deutschland nicht vor und sind auch keine Kommensale des Menschen. Als endemische Spezies sind sie in trockenen Gebieten Amerikas zu finden (Umeyama *et al.*, 2006).

6.3.6 Signalintensitäten

Die Signalintensitäten, die durch die Hybridisierung von 3 ng Referenz-DNA, was 10^4 bis 10^5 DNA-Molekülen entspricht, ermittelt werden konnten, zeigten häufig sehr hohe Werte, bis in den Sättigungsbereich der Detektion. Allerdings waren auch Sondensignale mit geringen Intensitätswerten zu verzeichnen wie bspw. Sonden für *Pseudallescheria boydii*, *Candida albicans* (vgl. Abbildung 30) oder *Malassezia furfur* (vgl. Abbildung 31). Für eine eindeutige Identifizierung und Diskriminierung fungaler Spezies sind die Oligonukleotidsequenz einer Sonde, insbesondere der GC-Gehalt und die Schmelztemperatur entscheidend. Aufgrund der sehr hohen Zahl an zu diskriminierenden Spezies und der damit verbundenen Einschränkung bei der Sondenentwicklung (vgl. 6.3.3) kann diese spezifische und diskriminierende Basenabfolge allerdings auch Ursache für geringe Signalintensitäten sein. Ein Grund dafür können bspw. Sekundärstrukturen sein (Lane *et al.*, 2004), die sich aufgrund der Sequenzabfolge ausbilden: Hairpins, Self-dimere oder andere sequenzabhängige Sekundärstrukturen. Die Sensitivitätsstudie der *Nested-PCR* anhand von *C. albicans* zeigte jedoch, dass selbst bei geringen Zellzahlen Intensitätswerte der zugehörigen Sonden von über 1.000 a.u., dem Schwellenwert für positive Signale, festgestellt werden konnten (vgl. Abbildung 26). Demnach stellen geringe Intensitätswerte für die Anwendung des entwickelten *PCR-Array-Systems* für die klinische Diagnostik kein Problem dar, solange das Signal/Hintergrund-Verhältnis groß genug ist.

6.4 Vergleich des entwickelten *PCR-Array-Systems* mit bestehenden Systemen

Die Spektren der bisher veröffentlichten ITS-basierten DNA-Mikroarrays zur Identifizierung humanpathogener Pilzspezies weisen teilweise dieselben Spezies auf, die mittels des in dieser Arbeit entwickelten *PCR-Array-Systems* identifiziert werden können. Im Jahr 2005 wurde ein DNA-Mikroarray zur Identifizierung von zwölf pathogenen *Candida*- und *Aspergillus*-Spezies (Leinberger *et al.*, 2005) veröffentlicht. Der hier entwickelte Array deckt diese zwölf Spezies ebenfalls ab, ermöglicht allerdings die Identifizierung von weiteren 43 fungalen Erregern. Im selben Jahr wurde ein Array zum Nachweis von 64 klinisch relevanten filamentösen Spezies veröffentlicht (Hsiao *et al.*, 2005). 18 dieser 64 Spezies können auch über das entwickelte *PCR-Array-System* identifiziert werden. Allerdings ermöglicht dieses zudem die Identifizierung klinisch relevanter Hefespezies, wohingegen sich der Array von Hsiao *et al.* auf den Nachweis filamentöser Spezies beschränkt. Diese genannten DNA-Mikroarrays basieren auf der Hybridisierung der gesamten ITS-Region nach Amplifikation durch das Primerpaar ITS 1+4 (White *et al.*, 1990) innerhalb einer *Singleplex-PCR*. Weitere DNA-Mikroarrays können wesentlich weniger pathogene Pilzspezies nachweisen als der entwickelte DNA-Mikroarray. Dabei handelt es sich um die Identifizierung sowohl von Hefe- als auch von Schimmelpilzen durch Hybridisierung von ITS-*Singleplex-PCR*-Produkten (Huang *et al.*, 2006, Campa *et al.*, 2008). Ein Mikroarray zur Identifizierung von 77 klinisch relevanten Hefen wurde im Jahr 2007 veröffentlicht (Leaw *et al.*, 2007). Der entwickelte Array ermöglicht in Summe den Nachweis weniger Spezies, allerdings beschränkt er sich nicht nur auf den Nachweis filamentöser Pilze wie es bei Leaw *et al.* der Fall ist. Die genannten Mikroarrays verwenden - wie der in dieser Arbeit entwickelte - die bereits im Jahr 1990 veröffentlichten ITS-Primer für die Amplifikation der zu hybridisierenden DNA (White *et al.*, 1990). Es wurden auch ITS-basierte Mikroarrays veröffentlicht, denen andere Primersequenzen für die PCR zugrunde lagen. Mittels speziesspezifischer Primer innerhalb einer *Multiplex-PCR* konnten bspw. 14 fungale Spezies identifiziert werden (Spiess *et al.*, 2007). Demnach kann die ITS-Region aufgrund konservierter und variabler Bereiche sowohl für eine panfungale als auch speziesspezifische Amplifikation herangezogen werden.

Zwei der genannten DNA-Mikroarrays wurden mit PCR-Produkten hybridisiert, die durch Verwendung von 100 ng DNA in einer *Singleplex-PCR* amplifiziert wurden (Leinberger *et al.*, 2005) (Campa *et al.*, 2008). Für *Candida albicans* beispielsweise entspräche dies einer DNA-Menge von 10^6 DNA-Molekülen. Die Sensitivität der angewandten *Singleplex-PCR* dürfte Ähnlichkeit mit der Sensitivität der ersten PCR der in dieser Arbeit etablierten *Nested-PCR* aufzeigen und wäre, gesetzt dieses Falles, eher gering und für die klinische Diagnostik nur begrenzt einsetzbar. In zwei weiteren Publikationen wurden 1 – 5 ng DNA in die *Singleplex-PCR* eingesetzt, deren Produkte anschließend hybridisiert wurden (Leaw *et al.*, 2007) (Hsiao *et al.*, 2005). Diese DNA-Menge entspricht 10^4 – 10^5 *C. albicans* oder *A. fumigatus* DNA-Molekülen womit diese PCR für eine klinische Anwendung ebenfalls nicht sensitiv genug ist. Die Sensitivität der von Spiess *et al.* entwickelten *Multiplex-PCR* unter Verwendung speziesspezifischer Primer ist mit einer geringsten nachzuweisenden DNA-Menge von 1 pg für *C. albicans* sehr hoch (Spiess *et al.*, 2007). Diese DNA-Menge entspricht ca. 70 DNA-Molekülen wodurch die Sensitivität dieser *Multiplex-PCR* mit der Sensitivität der etablierten *Nested-PCR* vergleichbar ist. Ein Grund für diese hohe Sensitivität könnte der Einsatz speziesspezifischer Primer sein, die hohe Amplifikationsraten der einzelnen Spezies ermöglichen. Allerdings schränkt die

Kapazität einer *Multiplex-PCR* die Anzahl spezifischer Primer und damit nachzuweisender Spezies ein, sodass sich der Nachweis auf 14 Spezies beschränkt (Spiess *et al.*, 2007).

Der in dieser Arbeit entwickelte DNA-Mikroarray umfasst ein Erregerspektrum von 56 fungalen Spezies, sowohl Hefe- als auch filamentöser Spezies. Damit grenzt sich der Array bereits durch das hohe vielseitige Erregerspektrum von den bisher veröffentlichten Arrays ab. Diese basieren ebenfalls auf der *Internal transcribed spacer*-Region des ribosomalen Clusters. In dieser Arbeit wurde eine *ITS-Nested-PCR* etabliert und Amplifikate dieser hybridisiert, was den für die klinische Diagnostik relevanten Vorteil einer sehr hohen Sensitivität des *PCR-Array-Systems* ermöglichte. In dieser Arbeit konnten mittels des entwickelten *PCR-Array-Systems* mindestens zehn fungale DNA-Moleküle zuverlässig nachgewiesen werden.

6.5 Signalverlagerung von Antisense- auf Sense-Sonden und umgekehrt

Während der PCR wird durch Elongation des Forward-Primers der DNA-Sense-Strang und durch Elongation des Reverse-Primers der Antisense-DNA-Strang gebildet. Hybridisiert der DNA-Sense-Strang im Normalfall an die Antisense-Sonde auf dem Mikroarray, bindet der Antisense-DNA-Strang an die Sense-Sonde. Demnach würde man Signale auf beiden Sonden - in Sense- und Antisense-Konfiguration erwarten. Tatsächlich waren die meisten Sondensignale in dieser Arbeit nur auf den Antisense-Sonden zu verzeichnen. Zudem konnte bei der zweiten PCR der *Nested-PCR* innerhalb der Sensitivitätsstudie eine Signalverlagerung bei Hybridisierung der seriell verdünnten DNA beobachtet werden: Bei hohen DNA-Molekülzahlen gingen die Signale von den Antisense-Sonden, bei niedrigen DNA-Molekülzahlen von den Sense-Sonden aus (vgl. 5.6). Womöglich könnte es sich in diesem Fall um die DNA-Menge als limitierenden Faktor handeln, die eine Signalverlagerung nach sich zieht. Bei zehn DNA-Molekülen könnte vermehrt einzelsträngige DNA der Antisense-Konfiguration vorgelegen haben, die zu Signalen auf der Sense-Sonde führte, wohingegen bei einem DNA-Molekül bevorzugt Sense-esDNA vorlag und damit Signale auf der Antisense-Sonde zu verzeichnen waren. Ebenso konnten Signale, die von beiden Sondenkonformationen ausgingen, beobachtet werden (vgl. 5.6).

Dally *et al.* veröffentlichten 2014 eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen. Dabei spielte einzelsträngige DNA (esDNA), die neben doppelsträngiger DNA (dsDNA) während der PCR entsteht, eine entscheidende Rolle. EsDNA konnte die Hybridisierung doppelsträngiger PCR-Produkte positiv beeinflussen, sodass erhöhte Signalintensitäten beobachtet werden konnten (Dally *et al.*, 2014). Im Fall dieser Arbeit könnte einzelsträngige Sense-DNA die Bindung Cy3-markierter doppelsträngiger PCR-Produkte an die Antisense-Sonde bzw. es-Antisense-DNA die Bindung an Sense-Sonden katalysiert haben. Da in den meisten Fällen Signale auf den Antisense-Sonden festzustellen waren, könnte ein Überschuss an einzelsträngiger Sense-DNA vorgelegen haben. Möglicherweise trat dies in Folge von nicht-äquimolaren Primerkonzentrationen auf. Die Primer wurden nach Angaben des Herstellers auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ eingestellt. Laut Hersteller kann die Oligonukleotid-Ausbeute allerdings um $\pm 20\%$ abweichen (Quelle Metabion), sodass ggf. inäquimolare Primerkonzentrationen in den PCR eingesetzt wurden.

Die Signalverlagerung von Antisense- auf Sense-Sonde oder umgekehrt ist demnach abhängig von der in die PCR eingesetzten DNA-Molekülzahl. Die Zahl der Erreger und demnach die Zahl der DNA-Moleküle in den Patientenproben ist allerdings unbekannt und führt bei Anwendung des *PCR-Array-Systems* dazu, dass beide Konfigurationen der Sonden gespottet werden müssten. Würden lediglich die Antisense-Sonden gespottet werden, würde es ggf. zu Signalausfällen aufgrund der fehlenden Sense-Sonden kommen. Dies hätte falsch-negative Ergebnisse und möglicherweise eine inadäquate Medikation zur Folge.

6.6 Evaluierung des etablierten *PCR-Array-Systems* mit DNA von Patientenproben

Das finale *PCR-Array-System* wurde für eine Anwendung in der klinischen Diagnostik etabliert. Aus diesem Grund wurde eine Evaluierung mit Patientenproben durchgeführt. Die verwendete DNA stammte aus 102 Patientenproben, wovon es sich bei 28 Proben um Bronchoalveoläre Lavages und bei 74 Proben um Trachealsekrete handelte, die von Herrn Prof. Knabbe und Dr. Weile vom Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin des Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde (vgl. Tabelle 67). Für jede Patientenprobe war der mikrobiologische Befund bekannt. Am HDZ durchgeführte Identifizierungen von *Candida* Spezies basierten zumeist auf differenzieller Kultivierung mittels chromID™ *Candida* von bioMérieux Deutschland GmbH. Durch Hydrolyse eines chromogenen Hexosaminidase Substrates bilden die Kolonien von *Candida albicans* nach 24 bis 48 stündiger Inkubation eine blaue Färbung aus. Die Nicht-*albicans Candida* Spezies *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* und *C. kefyr* können ein zweites Substrat hydrolysieren, wodurch die Kolonien der genannten Spezies rosa erscheinen (Quelle: bioMérieux Deutschland GmbH). Anhand dieser Methode konnte somit lediglich die Spezies *Candida albicans* von Nicht-*albicans Candida* Spezies unterschieden werden. Bei Einzelfällen wurden die Pathogene zudem mittels Massenspektrometrie oder Sequenzierungen identifiziert. Ob eine Probe anhand dieser spezifischen Methoden analysiert wurde, war von vielen Faktoren wie z.B. dem Schweregrad der Erkrankung des Patienten abhängig. Welche Methode für die Identifizierung der jeweiligen Patientenproben am HDZ angewandt wurde, war nicht bekannt.

6.6.1 Array-basierte Bestätigung des mikrobiologischen Befundes

Sondensignale von 37 monomikrobiellen Patientenproben bestätigten den Befund der durch mikrobiologische Methoden am HDZ erstellt wurden. Dabei handelte es sich in den meisten Fällen um *Candida albicans*-Infektionen. Die Signalintensitäten der zugehörigen *C. albicans*-Sonden wiesen bei einer Patientenprobe mit weniger als 10^3 KBE/ml Werte von 1.815 a.u. nahe des Detektionsschwellenwertes von 1.000 a.u. auf und hohe Signalintensitäten von 10.977 a.u. bei einer Probe mit 10^5 KBE/ml auf. Demnach wurden höhere bzw. niedrigere Signalintensitäten in Korrelation zu der im Befund angegebenen Zellzahl festgestellt. Die Ergebnisse der Sensitivitätsstudie zeigten allerdings, dass das etablierte *PCR-Array-System* kein quantitatives System repräsentiert, da die Signalintensitäten selbst innerhalb der Verdünnungsreihe stark schwankten (vgl. 5.6). Dies könnte z.B. auf Inhomogenität des Spottens zurückzuführen sein. Die Höhe der ermittelten Signalintensitäten ist damit nicht in Korrelation mit der Zellzahl zu setzen; das etablierte System ist als ein qualitatives System zu verstehen. In weiteren 14 Fällen wies der mikrobiologische Befund auf eine Infektion mit Nicht-*albicans Candida* Spezies hin. Die Signale, die auf dem Mikroarray festgestellt werden konnten, waren fünf unterschiedlichen *Candida* Spezies zuzuordnen: *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata*.

16 als polymikrobiell befundene Patientenproben wurden mit dem Array bestätigt. Dieselben zwei oder drei fungalen Spezies, die durch mikrobiologische Methoden am HDZ identifiziert werden konnten, wurden eindeutig über das hier etablierte Arraysystem nachgewiesen. Dabei lag die DNA-Menge der einzel-

nen Spezies wahrscheinlich in einem sehr ähnlichen Verhältnis zueinander vor. Die Coinfektionsversuche, die mit DNA der Referenzorganismen *C. albicans* und *A. fumigatus* durchgeführt wurden, zeigte, dass DNA eines Sekundärpathogens mindestens in einem 1:10-Verhältnis zur DNA des primären Pathogens vorliegen muss, um beide Spezies anhand von Signalen auf dem Mikroarray identifizieren zu können. Lag ein DNA-Verhältnis deutlich unter 1:10 zwischen Primär- und Sekundärpathogen vor, waren lediglich Signale des Primärpathogens feststellbar (vgl. 5.7.3). Auch bei polymikrobiellen Infektionen wies der mikrobiologische Befund auf Nicht-*albicans Candida* Spezies hin, die durch das etablierte *PCR-Array-System* unterschiedlichen *Candida* Spezies zugeordnet werden konnten: *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata*. In diesen Fällen war die Identifizierung anhand des etablierten *PCR-Array-Systems* spezifischer und schneller als die mikrobiologischen Methoden. Bei einer klinischen Anwendung des hier etablierten *PCR-Array-System* würde dies eine zeitnahe, gezielte Medikation nach Probennahme ermöglichen, was zu einer erhöhten Überlebenschance des Patienten führen könnte. Zudem bestünde eine geringere Gefahr der Resistenzentwicklung, da die Medikation an die jeweilige identifizierte Spezies gezielt angepasst werden könnte. Unerwünschte Nebenwirkungen von Antimykotika infolge vorbeugender Breitband-Anwendungen könnten ebenfalls reduziert werden.

6.6.1.1 Array-basierte Identifizierung von Spezies, die mikrobiologisch nicht identifiziert wurden

Einige Ergebnisse des Arrays von als monomikrobiell befundenen Patientenproben bestätigten zum einen die Infektion mit fungalen Spezies, die durch mikrobiologische Methoden am HDZ identifiziert wurden. Zum anderen waren auf dem Array weitere Signale festzustellen, die auf eine polymikrobielle Infektion hinwiesen. Dies war insbesondere bei mikrobiologisch als Nicht-*albicans Candida* (NAC) identifizierten Spezies der Fall. Signale auf dem Mikroarray waren hierbei bei mehr als einer NAC-Spezies festzustellen (vgl. Tabelle 43). Wurden diese Proben bspw. auf chromID™ *Candida* von bioMérieux Deutschland GmbH kultiviert, war eine Unterscheidung verschiedener NAC-Spezies wie *C. tropicalis*, *C. lusitanae* und *C. kefyr* grundsätzlich nicht möglich. Würde in der klinischen Diagnostik eine weitere Differenzierung von Nicht-*albicans Candida* Spezies angestrebt werden, wären additive Tests notwendig. Dabei kann es sich um massenspektrometrische Analysen, Sequenzierungen, PCR- oder weitere kultivierungsbasierte Methoden handeln. Dadurch würden weitere Kosten und zusätzlicher unerwünschter Zeitaufwand anfallen, der den Therapiebeginn der Patienten verzögern würde. In diesen Fällen würde die Anwendung des etablierten *PCR-Array-Systems* eine spezifischere Identifizierung in wesentlich kürzerer Zeit ohne zusätzliche Kosten erlauben.

Der mikrobiologische Befund weiterer Patientenproben wies u.a. auch auf eine monomikrobielle *Aspergillus fumigatus*-Infektion hin. Die Signale auf dem Mikroarray waren jedoch neben *A. fumigatus* auch der Spezies *A. terreus* zuzuordnen. Da bei der Evaluierung des Arrays mit Referenz-DNA bei diesen Spezies ausschließlich spezifische Signale festgestellt werden konnten, können diese Spezies anhand der entwickelten Sonden eindeutig diskriminiert werden. Bei diesen Patientenproben lag demnach sehr wahrscheinlich eine polymikrobielle Infektion mit beiden fungalen Erregern vor. Bei Verdacht auf eine Aspergillose

werden die Patientenproben oftmals durch mikroskopische Verfahren oder durch PCR-Methoden untersucht. Da es sich bei *A. fumigatus* um die klinisch relevanteste *Aspergillus* Spezies handelt, wird oftmals lediglich zwischen dieser Spezies und Nicht-*A. fumigatus*-Spezies unterschieden. Für die Unterscheidung verschiedener *Aspergillus* Spezies spielen neben Erfahrungswerten des Personals z.B. bei mikroskopischer Identifizierung ebenfalls die Diskriminierungseigenschaften der PCR eine wichtige Rolle. Bei einer Patientenprobe war auf dem Befund vermerkt, dass die Spezies *A. fumigatus* durch PCR positiv nachgewiesen werden konnte. Anhand des Mikroarrays waren neben Signalen für diese Spezies zudem Signale für *A. terreus*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, und *T. cutaneum/mucoides* feststellbar. Die durchgeführte PCR war lediglich auf Anwesenheit von *A. fumigatus*-DNA in Patientenproben ausgerichtet, sodass nur DNA dieser Spezies amplifiziert und nachgewiesen werden konnte.

Bei den 102 untersuchten Patientenproben handelte es sich ausschließlich um respiratorisches Material. Für Trachealsekrete und BALs ist das Vorkommen von *Candida* spp. oder *Aspergillus* spp. bei immunsupprimierten Patienten keine Seltenheit. Allerdings konnten auch Signale für fungale Pathogene der Haut gefunden werden wie bspw. *Trichosporon* spp. Die hohen Werte der Standardabweichungen der gemittelten Signalintensitäten zeigen, dass lediglich bei einem der beiden Replikat Signale über 1.000 a.u. ermittelt werden konnten (vgl. Abbildung 42). Aufgrund dessen und wegen der Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit einer Infektion der Atemwege mit kutanen Erregern sehr gering ist, handelt es sich wahrscheinlich um Kontamination mit dieser Spezies. Ob die Kontamination bereits während der Probennahme bspw. durch Hautkontakt oder nach Isolierung der Gesamt-DNA der Patientenprobe vorlag, kann dabei nicht festgestellt werden. Unabhängig von der Methode, die für eine Identifizierung der Erreger in einer Patientenprobe herangezogen wurde, spielt die Beurteilung des Befundes durch den behandelnden Arzt eine wichtige Rolle. Sowohl die Erfahrungswerte der Ärzte, die Kenntnis über die Anamnese der Patienten, die Art der Patientenprobe und der Ort der Probennahme sowie viele weitere Faktoren fließen in die Entscheidung über die Medikation und Therapie des Patienten ein.

6.6.1.2 Keine Array-basierte Identifizierung von mikrobiologisch identifizierten Spezies

In drei Fällen gab es Patientenproben bei denen der Array weniger Spezies als im Befund gelistet detektierte. Dabei handelte es sich bspw. laut Befund um polymikrobielle Infektionen mit *C. albicans* und Nicht-*albicans Candida* (NAC) Spezies. Auf dem Mikroarray wurden lediglich Signale für *C. albicans* oder in wenigen Fällen lediglich Signale für NAC-Spezies festgestellt. Eine Probe wies laut Befund eine Infektion mit *C. albicans* und *A. fumigatus* auf, wohingegen auf dem Mikroarray nur Signale für *C. albicans* ermittelt werden konnten. Somit würde es sich bei diesen Proben laut Array um monomikrobielle Infektionen handeln. Eine mögliche Erklärung für diese abweichenden Ergebnisse der beiden Identifikationsmethoden könnte darin liegen, dass die beiden Spezies in einem Verhältnis von unter 1:10 zueinander vorlagen, wodurch lediglich Signale für die dominantere Spezies, wie z.B. *C. albicans*, auf dem Mikroarray zu ermitteln waren (vgl. 5.7.3). *C. albicans* repräsentiert die klinisch relevanteste Hefe und kann z.B. bei Patienten mit Zystischer Fibrose für 95% der *Candida*-Infektionen verantwortlich gemacht werden (Chotirmall *et al.*, 2010). Weitere NAC-Spezies sind weniger oft vertreten und kommen nicht selten als Sekundärpathogen neben *C. albicans* vor. Eine Patientenprobe wies laut mikrobiologischem Befund die Spezies *C. albicans* und *C. glabrata* auf. Auf dem Mikroarray waren allerdings Signale für *C. albicans* und *C. dubliniensis* festzustellen. Bei der Sonde für *C. dubliniensis* handelt es sich um eine spezifische Sonde ohne falsch positive Signale. Zudem trat die Sonde auch nicht als unspezifisches Signal bei der Hybridisierung anderer Referenz-Spezies auf. Diese Eigenschaften treffen ebenfalls auf die Sonde für *C. glabrata* zu. Möglicherweise sind die teilweise uneindeutige Zuordnung der Färbungen bei ChromAgar und die subjektive Wahrnehmungen Grund für das abweichende Ergebnis der angewandten Methoden.

6.6.2 Abweichende Resultate von Array-basierter und mikrobiologischer Identifizierung

Zwei Patientenproben wiesen laut mikrobiologischem Befund Spezies auf, die nicht durch Signale auf dem Mikroarray bestätigt werden konnten. Allerdings konnten Signale für andere Spezies ermittelt werden. So lautete der Befund einer Patientenprobe NAC-Spezies, auf dem Mikroarray waren allerdings Signale auf der Sonde für *Aspergillus fumigatus* festzustellen. Da diese Spezies anhand ihrer Morphologie auf Festnährböden eindeutig zu unterscheiden sind, kann hier der Unterschied nur durch eine mögliche Verwechslung erklärt werden. Die Hybridisierung einer laut mikrobiologischem Befund monomikrobieller NAC-Probe führte nach Hybridisierung dieser zu Signalen auf Sonden für zwei Spezies: *A. fumigatus* und *C. albicans*. *Candida* Spezies wachsen im Vergleich zu *Aspergillus* Spezies etwas schneller. Möglicherweise waren die Myzelstrukturen des Schimmelpilzes noch nicht ausreichend sichtbar als die *Candida*-Kolonien hochgewachsen und zu identifizieren waren. Durch eine ungenaue Färbung der hochgewachsenen Kolonien könnte es zu einer NAC-Identifizierung gekommen sein. Da es sich bei der Sonde für *C. albicans* um eine spezifische Sonde ohne Kreuzreaktivitäten mit NAC-Spezies handelt, ist es nicht unwahrscheinlich, dass es sich um eine Infektion mit dieser Spezies handelte. Die Hybridisierung einer von 102 Patientenproben, die laut Befund über DNA von *C. tropicalis* verfügen sollte, führte zu keinerlei Signalen auf dem Mikroarray. Möglicherweise war die DNA in dieser Probe degradiert und somit durch die verwendeten Primer nicht mehr zu amplifizieren.

6.6.3 *Zwei-Sonden-Diskriminierung bei der Evaluierung mit Patientenproben*

Die Spezies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* und *C. lusitanae* konnten in den Patientenproben eindeutig durch speziesspezifische Sonden, die in den Evaluierungsversuchen mit Referenz-DNA keine unspezifischen Signale aufwiesen, nachgewiesen werden. Dahingegen konnten die Spezies *C. tropicalis*, *C. metapsilosis/orthopsilosis* und *C. krusei* anhand der *Zwei-Sonden-Diskriminierung* eindeutig identifiziert werden. Bei der Hybridisierung der kutan auftretenden Erregern *Epidermophyton floccosum* bzw. *Trichophyton rubrum* waren neben den spezifischen Signalen auch Signale auf den Sonden für *C. tropicalis* bzw. *C. metapsilosis/orthopsilosis* festzustellen. Wurden diese Spezies hybridisiert, traten ausschließlich spezifische Signale auf den zugehörigen Sonden auf. Bei der Hybridisierung bestimmter Patientenproben waren ebenfalls nur Signale von *C. tropicalis* bzw. *C. metapsilosis/orthopsilosis* festzustellen. Signale auf den Sonden für *Epidermophyton floccosum* bzw. *Trichophyton rubrum* waren nicht zu ermitteln. Ebenso verhielt es sich bei den Spezies *Aspergillus fumigatus* und *A. terreus*. Wurden diese in den Evaluierungsversuchen mit Referenz-DNA der Spezies hybridisiert, waren ausschließlich Signale auf den spezifischen Sonden festzustellen. Dies ermöglicht eine eindeutige Diskriminierung der Spezies untereinander sowohl in mono- als auch polymikrobiellen Infektionen. Die diesen Spezies zugehörigen Sonden kamen jedoch bei den Evaluierungen als unspezifische Signale vor. Die *A. fumigatus*-Sonde trat als unspezifische Sonde bei der Hybridisierung von *Ajellomyces dermatitidis*, *Mucor plumbeus* und *Malassezia furfur* auf. Unspezifische Signale auf der Sonde für *A. flavus* waren bei der Hybridisierung von *Rhizopus oryzae* festzustellen. Da in den Patientenproben lediglich auf den Sonden für *A. fumigatus* und/oder *A. flavus* Signale festzustellen waren, konnte davon ausgegangen werden, dass die anderen Spezies nicht die Ursache für diese Signale waren. Demnach erlaubt die *Zwei-Sonden-Diskriminierung* bei den untersuchten Patientenproben eine eindeutige Unterscheidung der beteiligten Spezies.

6.7 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Methode der in dieser Arbeit etablierten ITS-*Nested-PCR* zusammen mit den entwickelten ITS-Oligonukleotid-Sonden eine sehr sensitive und spezifische Methode darstellt und aufgrund dessen für diagnostische Anwendungen einsetzbar ist. Dabei handelt es sich um ein qualitatives System, welches keine Aussage über die Quantität der vorkommenden Pathogene in der Patientenprobe liefern kann. An dieser Stelle sei zu erwähnen, dass das Ergebnis des hier entwickelten *PCR-Array-Systems*, wie die Ergebnisse mikrobiologischer Methoden, zunächst durch erfahrene Ärzte beurteilt werden müssen. Je nach Art der Patientenprobe, Ort der Probennahme, bereits erfolgter Medikation, Anamnese und weiterer Aspekte kann der Arzt den Befund beurteilen und die Medikation anpassen.

Um die Spezifität des Arrays zu erhöhen, könnte die Zahl der zu diskriminierenden Spezies reduziert und auf die klinische Situation, z.B. Transplantationszentren, angepasst werden. Dies könnte zu einer Erhöhung der Möglichkeiten für Positionsorte der Sonden führen und dadurch die Spezifität dieser erhöhen. Allerdings müsste dies zunächst *in silico* überprüft werden. Zudem käme es sehr auf die Zahl der Spezies, den Verwandtschaftsgrad dieser, die Sequenzverfügbarkeit und auf weitere Aspekte an. Vorstellbar wäre ebenfalls eine Erweiterung des Arrays um Detektionssonden für Singlenukleotid-Polymorphismen in bestimmten Genen, die oftmals für Antimykotika-Resistenzen fungaler Spezies verantwortlich sind. Dadurch könnten neben einer Identifizierung pathogener Spezies simultan resistente Spezies identifiziert werden. Das PCR-System müsste zudem um Primer für die Amplifikation dieser Zielsequenzen erweitert bzw. angepasst werden. Der Einsatz dieses Arrays könnte nach vollständiger klinischer Validierung zu einer adäquaten, schnellen Medikation und damit zu einer erhöhten Lebenserwartung immunsupprimierter Patienten führen. Insbesondere für häufig vorkommende fungale Pathogene ist eine solche Validierung umsetzbar.

Literaturverzeichnis

Addrizzo-Harris, D. J., T. J. Harkin, G. McGuinness, D. P. Naidich and W. N. Rom (1997). "Pulmonary aspergilloma and AIDS a comparison of HIV-infected and HIV-negative individuals." *CHEST Journal* 111(3): 612-618.

Ahmad, S., Z. Khan, A. S. Mustafa and Z. U. Khan (2002). "Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: Comparison with Culture, Antigen Detection, and Biochemical Methods for Species Identification." *Journal of Clinical Microbiology* 40(7): 2483-2489.

Ahn, C. H., J.-W. Choi, G. Beaucage, J. H. Nevin, J.-B. Lee, A. Puntambekar and J. Y. Lee (2004). "Disposable smart lab on a chip for point-of-care clinical diagnostics." *Proceedings of the IEEE* 92(1): 154-173.

Anthony, R., T. Brown and G. French (2000). "Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array." *Journal of clinical microbiology* 38(2): 781-788.

Arney, K. L., R. Tiernan and M. A. Judson (1997). "Primary pulmonary involvement of *Fusarium solani* in a lung transplant recipient." *CHEST Journal* 112(4): 1128-1130.

Ascioglu, S., J. Rex, B. De Pauw, J. Bennett, J. Bille, F. Crokaert, D. Denning, J. Donnelly, J. Edwards and Z. Erjavec (2002). "Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus." *Clinical Infectious Diseases* 34(1): 7-14.

Bader, O., M. Weig, L. Taverne-Ghadwal, R. Lugert, U. Gross and M. Kuhns (2011). "Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry." *Clinical Microbiology and Infection* 17(9): 1359-1365.

Balajee, S. A., A. M. Borman, M. E. Brandt, J. Cano, M. Cuenca-Estrella, E. Dannaoui, J. Guarro, G. Haase, C. C. Kibbler, W. Meyer, K. O'Donnell, C. A. Petti, J. L. Rodriguez-Tudela, D. Sutton, A. Velegriaki and B. L. Wickes (2009). "Sequence-based identification of *Aspergillus*, *fusarium*, and *mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here?" *J Clin Microbiol* 47(4): 877-884.

Barns, S., D. Lane, M. Sogin, C. Bibeau and W. Weisburg (1991). "Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives." *Journal of bacteriology* 173(7): 2250-2255.

Batra, R., T. Boekhout, E. Gueho, F. J. Cabanes, T. L. Dawson, Jr. and A. K. Gupta (2005). "*Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts." *FEMS Yeast Res* 5(12): 1101-1113.

Bennett, J. E., K. Izumikawa and K. A. Marr (2004). "Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48(5): 1773-1777.

Bodrossy, L. and A. Sessitsch (2004). "Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics." *Current Opinion in Microbiology* 7(3): 245-254.

Bretagne, S., J.-M. Costa, A. Marmorat-Khuong, F. Poron, C. Cordonnier, M. Vidaud and J. Fleury-Feith (1995). "Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR." *Journal of clinical microbiology* 33(5): 1164-1168.

Burgener-Kairuz, P., J. Zuber, P. Jaunin, T. Buchman, J. Bille and M. Rossier (1994). "Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment." *Journal of clinical microbiology* 32(8): 1902-1907.

Butler, G., M. D. Rasmussen, M. F. Lin, M. A. Santos, S. Sakthikumar, C. A. Munro, E. Rheinbay, M. Grabherr, A. Forche, J. L. Reedy, I. Agrafioti, M. B. Arnaud, S. Bates, A. J. Brown, S. Brunke, M. C. Costanzo, D. A. Fitzpatrick, P. W. de Groot, D. Harris, L. L. Hoyer, B. Hube, F. M. Klis, C. Kodira, N. Lennard, M. E. Logue, R. Martin, A. M. Neiman, E. Nikolaou, M. A. Quail, J. Quinn, M. C. Santos, F. F. Schmitzberger, G. Sherlock, P. Shah, K. A. Silverstein, M. S. Skrzypek, D. Soll, R. Staggs, I. Stansfield, M. P. Stumpf, P. E. Sudbery, T. Srikantha, Q. Zeng, J. Berman, M. Berriman, J. Heitman, N. A. Gow, M. C. Lorenz, B. W. Birren, M. Kellis and C. A. Cuomo (2009). "Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes." *Nature* 459(7247): 657-662.

Byrnes, E. J., 3rd, R. J. Bildfell, S. A. Frank, T. G. Mitchell, K. A. Marr and J. Heitman (2009a). "Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States." *J Infect Dis* 199(7): 1081-1086.

Byrnes, E. J., 3rd, W. Li, Y. Lewit, J. R. Perfect, D. A. Carter, G. M. Cox and J. Heitman (2009b). "First reported case of *Cryptococcus gattii* in the Southeastern USA: implications for travel-associated acquisition of an emerging pathogen." *PLoS One* 4(6): e5851.

Cafarchia, C., D. Romito, G. Capelli, J. Guillot and D. Otranto (2006). "Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis." *Veterinary dermatology* 17(5): 327-331.

Campa, D., A. Tavanti, F. Gemignani, C. S. Mogavero, I. Bellini, F. Bottari, R. Barale, S. Landi and S. Senesi (2008). "DNA microarray based on arrayed-primer extension technique for identification of pathogenic fungi responsible for invasive and superficial mycoses." *J Clin Microbiol* 46(3): 909-915.

Chagas-Neto, T. C., G. M. Chaves and A. L. Colombo (2008). "Update on the genus *Trichosporon*." *Mycopathologia* 166(3): 121-132.

Chakrabarti, A., R. S. Marak, M. R. Shivaprakash, S. Gupta, R. Garg, V. Sakhuja, S. Singhal, A. Baghela, A. Dixit, M. K. Garg and A. A. Padhye (2010). "Cavitary pulmonary zygomycosis caused by *Rhizopus homothallicus*." *J Clin Microbiol* 48(5): 1965-1969.

Chen, Y., J. Eisner, M. Kattar, S. Rassoulian-Barrett, K. LaFe, S. Yarfitz, A. Limaye and B. Cookson (2000). "Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes." *Journal of clinical microbiology* 38(6): 2302-2310.

Chen, Y. C., J. D. Eisner, M. M. Kattar, S. L. Rassoulian-Barrett, K. Lafe, U. Bui, A. P. Limaye and B. T. Cookson (2001). "Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts." *J Clin Microbiol* 39(11): 4042-4051.

- Chiu, C. Y., A. Urisman, T. L. Greenhow, S. Rouskin, S. Yagi, D. Schnurr, C. Wright, W. L. Drew, D. Wang and P. S. Weintrub (2008). "Utility of DNA microarrays for detection of viruses in acute respiratory tract infections in children." *The Journal of pediatrics* 153(1): 76-83. e71.
- Chizhikov, V., A. Rasooly, K. Chumakov and D. D. Levy (2001). "Microarray analysis of microbial virulence factors." *Appl Environ Microbiol* 67(7): 3258-3263.
- Chotirmall, S. H., E. O'Donoghue, K. Bennett, C. Gunaratnam, S. J. O'Neill and N. G. McElvaney (2010). "Sputum *Candida albicans* presages FEV(1) decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis." *Chest* 138(5): 1186-1195.
- Cleven, B. E., M. Palka-Santini, J. Gielen, S. Meembor, M. Kronke and O. Krut (2006). "Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray." *J Clin Microbiol* 44(7): 2389-2397.
- Coignard, C., S. F. Hurst, L. E. Benjamin, M. E. Brandt, D. W. Warnock and C. J. Morrison (2004). "Resolution of Discrepant Results for *Candida* Species Identification by Using DNA Probes." *Journal of Clinical Microbiology* 42(2): 858-861.
- Coleman, D. C., D. J. Sullivan, D. E. Bennett, G. P. Moran, H. J. Barry and D. B. Shanley (1997). "Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*." *Aids* 11(5): 557-567.
- Dally, S., S. Rupp, K. Lemuth, S. C. Hartmann, E. Hiller, S. M. Bailer, C. Knabbe and J. Weile (2014). "Single-Stranded DNA Catalyzes Hybridization of PCR-Products to Microarray Capture Probes." *PloS one* 9(7): e102338.
- Datta, K., K. H. Bartlett, R. Baer, E. Byrnes, E. Galanis, J. Heitman, L. Hoang, M. J. Leslie, L. MacDougall, S. S. Magill, M. G. Morshed, K. A. Marr and N. Cryptococcus gattii Working Group of the Pacific (2009). "Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States." *Emerg Infect Dis* 15(8): 1185-1191.
- Daw, R. and J. Finkelstein (2006). "Lab on a chip." *Nature* 442(7101): 367-367.
- de Lima Barros, M. B., R. de Almeida Paes and A. O. Schubach (2011). "*Sporothrix schenckii* and sporotrichosis." *Clinical microbiology reviews* 24(4): 633-654.
- DeMaio, J. and L. Colman (2000). "The use of adjuvant interferon- γ therapy for hepatosplenic *Blastoschizomyces capitatus* infection in a patient with leukemia." *Clinical infectious diseases* 31(3): 822-824.
- Doering, T. L. (2000). "How does *Cryptococcus* get its coat?" *Trends in microbiology* 8(12): 547-553.
- Einax, E. (2003). "Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi." *Organisms Diversity & Evolution* 3(3): 185-194.

- El-Ebiary, M., A. Torres, N. Fabregas, J. P. de la BELLACASA, J. Gonzalez, J. Ramirez, D. del BAÑO, C. Hernandez and M. Jiménez de Anta (1997). "Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients: an immediate postmortem histologic study." *American journal of respiratory and critical care medicine* 156(2): 583-590.
- Emmons, C. W. (1934). "Dermatophytes: natural grouping based on the form of the spores and accessory organs." *Archives of Dermatology and Syphilology* 30(3): 337-362.
- Espy, M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. Cockerill, 3rd and T. F. Smith (2006). "Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing." *Clin Microbiol Rev* 19(1): 165-256.
- Farina, C., G. Russello, S. Andreoni, C. Bonetti, M. Conte, P. Fazi, G. Lombardi, F. Luzzaro, E. Manso and P. Marone (2012). "Microarray technology for yeast identification directly from positive blood cultures. A multicenter Italian experience." *Medical Mycology* 50(5): 549-555.
- Fernandez, J., B. L. Erstad, W. Petty and D. E. Nix (2009). "Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections." *Diagn Microbiol Infect Dis* 64(4): 402-407.
- Ferrer, C., F. Colom, S. Frasés, E. Mulet, J. L. Abad and J. L. Alió (2001). "Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8 S ribosomal DNA typing in ocular infections." *Journal of clinical microbiology* 39(8): 2873-2879.
- Fisher, M., G. Koenig, T. White and J. Taylor (2002). "Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*." *Mycologia* 94(1): 73-84.
- Fouassier, M., D. Joly, M. Cambon, H. Peigue-Lafeuille and P. Condat (1998). "Infection à *Geotrichum capitatum* chez un patient neutropénique. À propos d'un cas et revue de la littérature." *La Revue de médecine interne* 19(6): 431-433.
- Gaitanis, G., P. Magiatis, M. Hantschke, I. D. Bassukas and A. Velegraki (2012). "The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases." *Clin Microbiol Rev* 25(1): 106-141.
- Galán-Sánchez, F., P. García-Martos, C. Rodríguez-Ramos, P. Marín-Casanova and J. Mira-Gutiérrez (1999). "Microbiological characteristics and susceptibility patterns of strains of *Rhodotorula* isolated from clinical samples." *Mycopathologia* 145(3): 109-112.
- Giammarinaro, P., S. Leroy, J. P. Chacornac, J. Delmas and R. Talon (2005). "Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level." *J Clin Microbiol* 43(8): 3673-3680.
- Gilgado, F., J. Cano, J. Gene and J. Guarro (2005). "Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species." *J Clin Microbiol* 43(10): 4930-4942.
- Gillum, A. M., E. Y. Tsay and D. R. Kirsch (1984). "Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations." *Molecular and General Genetics* MGG 198(1): 179-182.

Girmenia, C., L. Pagano, B. Martino, D. D'Antonio, R. Fanci, G. Specchia, L. Melillo, M. Buelli, G. Pizzarelli, M. Venditti, P. Martino and G. I. Program (2005). "Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature." *J Clin Microbiol* 43(4): 1818-1828.

Godoy, P., F. Nunes, V. Silva, J. Tomimori-Yamashita, L. Zaror and O. Fischman (2004). "Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brazil." *Mycopathologia* 157(3): 287-290.

Goldani, L., D. Craven and A. Sugar (1995). "Central venous catheter infection with *Rhodotorula minuta* in a patient with AIDS taking suppressive doses of fluconazole." *Journal of medical and veterinary mycology* 33(4): 267-270.

Guschin, D. Y., B. K. Mobarry, D. Proudnikov, D. A. Stahl, B. E. Rittmann and A. D. Mirzabekov (1997). "Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology." *Applied and environmental microbiology* 63(6): 2397-2402.

Healy, M., K. Reece, D. Walton, J. Huong, K. Shah and D. P. Kontoyiannis (2004). "Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR." *J Clin Microbiol* 42(9): 4016-4024.

Heller, M. J. (2002). "DNA microarray technology: devices, systems, and applications." *Annu Rev Biomed Eng* 4: 129-153.

Hoffmann, K., S. Discher and K. Voigt (2007). "Revision of the genus *Absidia* (*Mucorales*, *Zygomycetes*) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladaceae* fam. nov." *Mycological research* 111(10): 1169-1183.

Hsiao, C. R., L. Huang, J. P. Bouchara, R. Barton, H. C. Li and T. C. Chang (2005). "Identification of medically important molds by an oligonucleotide array." *J Clin Microbiol* 43(8): 3760-3768.

Huang, A., J. W. Li, Z. Q. Shen, X. W. Wang and M. Jin (2006). "High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray." *J Clin Microbiol* 44(9): 3299-3305.

Jaeger, E. E., N. M. Carroll, S. Choudhury, A. A. Dunlop, H. M. Towler, M. M. Matheson, P. Adamson, N. Okhravi and S. Lightman (2000). "Rapid Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* Species in Ocular Samples Using Nested PCR." *Journal of clinical microbiology* 38(8): 2902-2908.

Johnson, D. C. (2012). "Chronic Candidal Bronchitis: A Consecutive Series." *The open respiratory medicine journal* 6: 145.

Kano, R., Y. Nakamura, S. Watanabe, H. Tsujimoto and A. Hasegawa (1999). "Phylogenetic relation of *Epidermophyton floccosum* to the species of *Microsporum* and *Trichophyton* in chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences." *Mycopathologia* 146(3): 111-113.

Karkowska-Kuleta, J., M. Rapala-Kozik and A. Kozik (2009). "Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*." *Acta Biochimica Polonica* 56(2): 211.

Karnak, D., S. Beng-Sun, S. Beder and O. Kayacan (2001). "Chlamydia pneumoniae infection and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)." *Respiratory Medicine* 95(10): 811-816.

Kennedy, W., L. Milne, W. Blyth and G. Crompton (1972). "Two unusual organisms, *Aspergillus terreus* and *Metschnikowia pulcherrima*, associated with the lung disease of ankylosing spondylitis." *Thorax* 27(5): 604-610.

Korabecna, M. (2007). "The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology." *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology* 105: 783-787.

Kurtzman, C., J. W. Fell and T. Boekhout (2011). *The yeasts: a taxonomic study*, Elsevier.

Lane, S., J. Evermann, F. Loge and D. R. Call (2004). "Amplicon secondary structure prevents target hybridization to oligonucleotide microarrays." *Biosens Bioelectron* 20(4): 728-735.

Larone, D. H. (1993). *Medically important fungi: a guide to identification*, American Society for Microbiology.

Latgé, J.-P. (2001). "The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*." *Trends in microbiology* 9(8): 382-389.

Leaw, S. N., H. C. Chang, R. Barton, J. P. Bouchara and T. C. Chang (2007). "Identification of medically important *Candida* and non-*Candida* yeast species by an oligonucleotide array." *J Clin Microbiol* 45(7): 2220-2229.

Leinberger, D. M., U. Schumacher, I. B. Autenrieth and T. T. Bachmann (2005). "Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses." *J Clin Microbiol* 43(10): 4943-4953.

Letowski, J., R. Brousseau and L. Masson (2004). "Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays." *Journal of Microbiological Methods* 57(2): 269-278.

Lindemann, H. and M. Ballmann (2004). *Mukoviszidose-Zystische Fibrose*, Thieme Stuttgart.

Lo, H.-J., J. R. Köhler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti and G. R. Fink (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." *Cell* 90(5): 939-949.

Lockhart, S. R., S. A. Messer, M. A. Pfaller and D. J. Diekema (2008). "Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*." *J Clin Microbiol* 46(8): 2659-2664.

Lodder, J. and N. J. Kreger-van Rij (1952). "The yeasts-a taxonomic study." *The yeasts-a taxonomic study*.

Loeffler, J., H. Hebart, R. Bialek, L. Hagemeyer, D. Schmidt, F.-P. Serey, M. Hartmann, J. Eucker and H. Einsele (1999). "Contaminations occurring in fungal PCR assays." *Journal of clinical microbiology* 37(4): 1200-1202.

Lott, T. J., R. J. Kuykendall and E. Reiss (1993). "Nucleotide sequence analysis of the 5- 8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species." *Yeast* 9(11): 1199-1206.

- Lowinger-Seoane, M., J. M. Torres-Rodríguez, N. Madrenys-Brunet, S. Aregall-Fusté and P. Saballs (1992). "Extensive dermatophytoses caused by *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis* in a patient with AIDS." *Mycopathologia* 120(3): 143-146.
- Loy, A. and L. Bodrossy (2006). "Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays." *Clin Chim Acta* 363(1-2): 106-119.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb and W. Förster (2004). "ARB: a software environment for sequence data." *Nucleic acids research* 32(4): 1363-1371.
- Marier, R., B. Zakhireh, J. Downs, B. Wynne, G. L. Hammond and V. T. Andriole (1978). "Trichosporon cutaneum endocarditis." *Scandinavian journal of infectious diseases* 10(3): 255-256.
- Marimon, R., J. Gené, J. Cano, L. Trilles, M. D. S. Lazéra and J. Guarro (2006). "Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*." *Journal of clinical microbiology* 44(9): 3251-3256.
- McNeil, M. M., S. L. Nash, R. A. Hajjeh, M. A. Phelan, L. A. Conn, B. D. Plikaytis and D. W. Warnock (2001). "Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980–1997." *Clinical Infectious Diseases* 33(5): 641-647.
- Medrano, F. J., M. Montes-Cano, M. Conde, C. De La Horra, N. Respaldiza, A. Gasch, M. J. Perez-Lozano, J. M. Varela and E. J. Calderon (2005). "Pneumocystis jirovecii in general population." *Emerging infectious diseases* 11(2): 245.
- Morrell, M., V. J. Fraser and M. H. Kollef (2005). "Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality." *Antimicrob Agents Chemother* 49(9): 3640-3645.
- Mulè, G., A. Susca, G. Stea and A. Moretti (2004). "Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences." *FEMS Microbiology Letters* 230(2): 235-240.
- Muñoz, P., E. Bouza, M. Cuenca-Estrella, J. M. Eiros, M. J. Pérez, M. Sánchez-Somolinos, C. Rincón, J. Hortal and T. Peláez (2005). "Saccharomyces cerevisiae fungemia: an emerging infectious disease." *Clinical Infectious Diseases* 40(11): 1625-1634.
- Neafsey, D. E., B. M. Barker, T. J. Sharpton, J. E. Stajich, D. J. Park, E. Whiston, C. Y. Hung, C. McMahan, J. White, S. Sykes, D. Heiman, S. Young, Q. Zeng, A. Abouelleil, L. Aftuck, D. Bessette, A. Brown, M. FitzGerald, A. Lui, J. P. Macdonald, M. Priest, M. J. Orbach, J. N. Galgiani, T. N. Kirkland, G. T. Cole, B. W. Birren, M. R. Henn, J. W. Taylor and S. D. Rounsley (2010). "Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control." *Genome Res* 20(7): 938-946.
- Paranjape, V., B. G. Roy and A. Datta (1990). "Involvement of calcium, calmodulin and protein phosphorylation in morphogenesis of *Candida albicans*." *Journal of general microbiology* 136(11): 2149-2154.

Pfaller, M., R. Jones, G. Doern, A. Fluit, J. Verhoef, H. Sader, S. Messer, A. Houston, S. Coffman and R. Hollis (1999). "International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 35(1): 19-25.

Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, J. Kroeger, S. A. Messer, S. Tendolkar and D. J. Diekema (2008). "In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance." *J Clin Microbiol* 46(1): 150-156.

Pfaller, M. A., D. J. Diekema, R. N. Jones, H. S. Sader, A. C. Fluit, R. J. Hollis, S. A. Messer and S. P. Group (2001). "International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program." *Journal of Clinical Microbiology* 39(9): 3254-3259.

Porro, A. M., M. C. Yoshioka, S. K. Kaminski, M. d. C. d. A. Palmeira, O. Fischman and M. M. Alchorne (1997). "Disseminated dermatophytosis caused by *Microsporum gypseum* in two patients with the acquired immunodeficiency syndrome." *Mycopathologia* 137(1): 9-12.

Pospisil, L. (1989). "The significance of *Candida pulcherrima* findings in human clinical specimens." *Mycoses* 32(11): 581-583.

Pruesse, E., C. Quast, K. Knittel, B. M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies and F. O. Glockner (2007). "SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB." *Nucleic Acids Res* 35(21): 7188-7196.

Pulimood, S., L. Ganesan, G. Alangaden and P. Chandrasekar (2002). "Polymicrobial candidemia." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 44(4): 353-357.

Quinton, P. M. (1983). "Chloride impermeability in cystic fibrosis." *Nature* 301(5899): 421-422.

RAMANI, R., C. Srinivas, A. RAMANI, T. Kumari and P. Shivananda (1993). "Molds in onychomycosis." *International journal of Dermatology* 32(12): 877-878.

Ratushna, V. G., J. W. Weller and C. J. Gibas (2005). "Secondary structure in the target as a confounding factor in synthetic oligomer microarray design." *BMC Genomics* 6: 31.

Reuter, C. W., M. A. Morgan, F.-C. Bange, F. Gunzer, M. Eder, B. Hertenstein and A. Ganser (2005). "*Candida kefyr* as an emerging pathogen causing nosocomial bloodstream infections in neutropenic leukemia patients." *Clinical infectious diseases* 41(9): 1365-1366.

Rolston, K. V., G. P. Bodey and A. Safdar (2007). "Polymicrobial infection in patients with cancer: an underappreciated and underreported entity." *Clin Infect Dis* 45(2): 228-233.

Roostita, R. and G. Fleet (1996). "The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses." *International journal of food microbiology* 28(3): 393-404.

Ruhnke, M. (2007). *Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten*, UNI-MED Verlag.

- San-Blas, G., G. Niño-Vega and T. Iturriaga (2002). "Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics." *Medical Mycology* 40(3): 225-242.
- Sanborn, M. E., B. K. Connolly, K. Gurunathan and M. Levitus (2007). "Fluorescence properties and photophysics of the sulfoindocyanine Cy3 linked covalently to DNA." *The Journal of Physical Chemistry B* 111(37): 11064-11074.
- Schabereiter-Gurtner, C., B. Selitsch, M. L. Rotter, A. M. Hirschl and B. Willinger (2007). "Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens." *J Clin Microbiol* 45(3): 906-914.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* 270(5235): 467-470.
- Schmidt-Heydt, M. and R. Geisen (2007). "A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food." *International journal of food microbiology* 117(2): 131-140.
- Sia, S. K. and L. J. Kricka (2008). "Microfluidics and point-of-care testing." *Lab on a Chip* 8(12): 1982-1983.
- Simoneau, E., M. Kelly, A. Labbe, J. Roy and M. Laverdiere (2004). "What is the clinical significance of positive blood cultures with *Aspergillus* sp in hematopoietic stem cell transplant recipients? A 23 year experience." *Bone marrow transplantation* 35(3): 303-306.
- Spellberg, B., J. Edwards, Jr. and A. Ibrahim (2005). "Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management." *Clin Microbiol Rev* 18(3): 556-569.
- Spiess, B., W. Seifarth, M. Hummel, O. Frank, A. Fabarius, C. Zheng, H. Morz, R. Hehlmann and D. Buchheidt (2007). "DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients." *J Clin Microbiol* 45(11): 3743-3753.
- Srinivasan, V., V. K. Pamula, M. G. Pollack and R. B. Fair (2003). Clinical diagnostics on human whole blood, plasma, serum, urine, saliva, sweat, and tears on a digital microfluidic platform. *Proc. μ TAS*.
- Sudbery, P. E. (2001). "The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization." *Molecular microbiology* 41(1): 19-31.
- Sullivan, D. J., G. Moran, S. Donnelly, S. Gee, E. Pinjon, B. McCartan, D. B. Shanley and D. C. Coleman (1999). "*Candida dubliniensis*: an update." *Revista iberoamericana de micología* 16: 72-76.
- Supparatpinyo, K., J. Perriens, K. E. Nelson and T. Sirisanthana (1998). "A controlled trial of itraconazole to prevent relapse of *Penicillium marneffei* infection in patients infected with the human immunodeficiency virus." *New England Journal of Medicine* 339(24): 1739-1743.
- Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. Gow, M. C. Maiden and F. C. Odds (2005). "*Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III." *J Clin Microbiol* 43(1): 284-292.

- Tietz, H.-J. (2006). *Antimykotika von AZ*, Thieme, Stuttgart.
- Tomazelli Coltro, W. K., C. M. Cheng, E. Carrilho and D. P. Jesus (2014). "Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications." *Electrophoresis* 35(16): 2309-2324.
- Umeyama, T., A. Sano, K. Kamei, M. Niimi, K. Nishimura and Y. Uehara (2006). "Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification." *J Clin Microbiol* 44(5): 1859-1862.
- Vincent, J.-L., D. J. Bihari, P. M. Suter, H. A. Bruining, J. White, M.-H. Nicolas-Chanoin, M. Wolff, R. C. Spencer and M. Hemmer (1995). "The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study." *Jama* 274(8): 639-644.
- Wang, D., L. Coscoy, M. Zylberberg, P. C. Avila, H. A. Boushey, D. Ganem and J. L. DeRisi (2002). "Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(24): 15687-15692.
- Weitzman, I. and R. C. Summerbell (1995). "The dermatophytes." *Clinical microbiology reviews* 8(2): 240-259.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18: 315-322.
- Woo, P. C. Y., S.-Y. Leung, A. H. Y. Ngan, S. K. P. Lau and K.-Y. Yuen (2012). "A significant number of reported *Absidia corymbifera* (*Lichtheimia corymbifera*) infections are caused by *Lichtheimia ramosa* (syn. *Lichtheimia hongkongensis*): an emerging cause of mucormycosis." *Emerging Microbes & Infections* 1(8): e15.
- Wu, Z., Y. Tsumura, G. Blomquist and X. R. Wang (2003). "18S rRNA Gene Variation among Common Airborne Fungi, and Development of Specific Oligonucleotide Probes for the Detection of Fungal Isolates." *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5389-5397.
- Xu, J., A. R. Ramos, R. Vilgalys and T. G. Mitchell (2000). "Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*." *Journal of clinical microbiology* 38(3): 1214-1220.
- Ypma-Wong, M. F., W. A. Fonzi and P. S. Sypherd (1992). "Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*." *Infection and immunity* 60(10): 4140-4145.
- Zeng, X., F. Kong, C. Halliday, S. Chen, A. Lau, G. Playford and T. C. Sorrell (2007). "Reverse line blot hybridization assay for identification of medically important fungi from culture and clinical specimens." *J Clin Microbiol* 45(9): 2872-2880.

Anhang

Detektionsumfang des FYI-Chips

Tabelle 46: Detektionsumfang des FYI-Chips. Aufgelistet sind 56 Spezies, ihre Einteilung in Zygo-, Basidio- und Ascomyceten, ihre Wachstumsformen und das Vorkommen der Spezies in Organen und Körperregionen von Patienten. (Larone, 1993)¹, (Batra et al., 2005)², (Lowinger-Seoane et al., 1992)³, (Porro et al., 1997)⁴, (Bretagne et al., 1995)⁵, (Addrizzo-Harris et al., 1997)⁶, (Simoneau et al., 2004)⁷, (Byrnes et al., 2009a)⁸, (DeMaio und Colman, 2000)⁹, (Arney et al., 1997)¹⁰, (Supparatpinyo et al., 1998)¹¹, (Muñoz et al., 2005)¹²

Spezies	Einteilung	Wachstumsform	Vorkommen
<i>Absidia caerulea</i>	Zygomycet	filamentös	Keine Angabe
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Zygomycet	filamentös	Lunge, NNH, Hirn, Augen, Haut, Organe ^[1]
<i>Absidia cylindrospora</i>	Zygomycet	filamentös	Keine Angabe
<i>Absidia glauca</i>	Zygomycet	filamentös	Keine Angabe
<i>Absidia spinosa</i>	Zygomycet	filamentös	Keine Angabe
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Ascomycet	einzellig	Lunge, Blut, Organe ^[1]
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	Ascomycet	einzellig	Lunge, Haut, Knochen, Organe ^[1]
<i>Arthroderma gypseum</i>	Ascomycet	filamentös	Haut ^[1, 2, 3, 4]
<i>Arthroderma otae</i>	Ascomycet	filamentös	Haut ^[1, 2, 3]
<i>Aspergillus flavus</i>	Ascomycet	filamentös	Lunge ^[5, 6]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ascomycet	filamentös	Lunge ^[1, 5, 6, 7]
<i>Aspergillus niger</i>	Ascomycet	filamentös	Lunge ^[5, 6, 7]
<i>Aspergillus terreus</i>	Ascomycet	filamentös	Lunge ^[5, 6, 7]
<i>Candida albicans</i>	Ascomycet	einzellig/filamentös	Blut, Haut, Lunge ^[1]
<i>Candida dubliniensis</i>	Ascomycet	einzellig/filamentös	Blut, Haut, Lunge ^[1]
<i>Candida famata</i>	Ascomycet	einzellig	Blut, Haut ^[1]
<i>Candida glabrata</i>	Ascomycet	einzellig	Blut, Haut, Lunge ^[1]
<i>Candida guilliermondii</i>	Ascomycet	einzellig/filamentös	Blut, Haut ^[1]
<i>Candida kefyr</i>	Ascomycet	einzellig/filamentös	Blut, Haut ^[1]
<i>Candida krusei</i>	Ascomycet	einzellig/filamentös	Blut, Haut ^[1]
<i>Candida lusitanae</i>	Ascomycet	einzellig/filamentös	Blut, Haut ^[1]
<i>Candida metapsilosis</i>	Ascomycet	einzellig	Blut, Haut ^[1]
<i>Candida orthopsilosis</i>	Ascomycet	einzellig	Blut, Haut ^[1]
<i>Candida parapsilosis</i>	Ascomycet	einzellig/filamentös	Blut, Haut, Lunge ^[1]
<i>Candida pulcherrima</i>	Ascomycet	einzellig	Blut, Haut ^[1]
<i>Candida tropicalis</i>	Ascomycet	einzellig/filamentös	Blut, Haut ^[1]
<i>Coccidioides asahii/posadasii</i>	Ascomycet	einzellig	Lunge, Haut, Organe ^[1]
<i>Cryptococcus gattii</i>	Basidiomycet	einzellig, Capsid	Lunge, ZNS, Blut ^[1, 8]
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	Basidiomycet	einzellig, Capsid	Lunge, ZNS, Blut ^[1, 8]
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Basidiomycet	einzellig, Capsid	Lunge, ZNS, Blut ^[1, 8]
<i>Dipodascus capitatus</i>	Ascomycet	filamentös	Lunge, Organe ^[9]
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Ascomycet	filamentös	Haut ^[1]
<i>Fusarium solani</i>	Ascomycet	filamentös	Haut ^[10]
<i>Malassezia furfur</i>	Basidiomycet	einzellig/selten hyphale Elemente	Haut ^[1, 2]
<i>Mucor hiemalis</i>	Zygomycet	filamentös	Lunge, NNH, Hirn, Augen, Haut, Organe ^[1]
<i>Mucor plumbeus</i>	Zygomycet	filamentös	Lunge, NNH, Hirn, Augen, Haut, Organe ^[1]
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Zygomycet	filamentös	Lunge, NNH, Hirn, Augen, Haut, Organe ^[1]
<i>Mucor racemosus</i>	Zygomycet	filamentös	Lunge, NNH, Hirn, Augen, Haut, Organe ^[1]
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Ascomycet	hefeartig	Lunge, Haut, Organe ^[1]
<i>Penicillium marneffei</i>	Ascomycet	hefeartig/filamentös	Blut, Haut, Lunge ^[1, 11]
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Ascomycet	einzellig	Lunge ^[1]
<i>Pseudallescheria boydii</i>	Ascomycet	filamentös	Blut ^[1]
<i>Rhizopus microsporus</i>	Zygomycet	filamentös	Lunge, NNH, Hirn, Augen, Haut, Organe ^[1]
<i>Rhizopus oryzae</i>	Zygomycet	filamentös	Lunge, NNH, Hirn, Augen, Haut, Organe ^[1]
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Zygomycet	filamentös	Lunge, NNH, Hirn, Augen, Haut, Organe ^[1]
<i>Rhodotorula minuta</i>	Basidiomycet	einzellig	Blut, Gehirn ^[1]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycet	einzellig/filamentös	Blut ^[12]
<i>Sporothrix schenckii</i>	Ascomycet	hefeartig/ hyphale Elemente	Haut, Knochen, Lunge ^[1]
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Ascomycet	Hyphen	Haut ^[3]
<i>Trichophyton rubrum</i>	Ascomycet	Hyphen	Haut ^[3]

Spezies	Einteilung	Wachstumsform	Vorkommen
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Ascomycet	Hyphen	Haut ^[3]
<i>Trichosporon asahii</i>	Basidiomycet	Hyphen	Lunge, Leber, Herz, Haut, Haare ^[3]
<i>Trichosporon asteroides</i>	Basidiomycet	Hyphen	Lunge, Leber, Herz, Haut, Haare ^[3]
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Basidiomycet	Hyphen	Lunge, Leber, Herz, Haut, Haare ^[3]
<i>Trichosporon mucoides</i>	Basidiomycet	Hyphen	Lunge, Leber, Herz, Haut, Haare ^[3]

Synonyme der 56 Hefe- und Schimmelpilzspezies

Tabelle 47: Synonyme der 56 humanpathogenen Hefe- und Schimmelpilzspezies. Quellen: <http://www.straininfo.net/>, <http://www.uniprot.org/taxonomy/>, <http://www.doctorfungus.org/>, <http://www.mycobank.org/>, <http://www.cbs.knaw.nl/>, <http://www.lgcstandards-atcc.org>

Spezies	Synonyme
<i>Absidia caerulea</i>	<i>Absidia coerulea</i>
<i>Absidia cylindrospora</i>	
<i>Absidia glauca</i>	
<i>Absidia spinosa</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Petromyces flavus</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Sartorya fumigata</i> , <i>Neosartorya fumigata</i> , <i>Aspergillus phialiseptus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Aspergillus terreus</i>	
<i>Ajellomyces capsulatum</i>	<i>Histoplasma capsulatus</i> , <i>Ajellomyces capsulate</i> , <i>Histoplasma duboisii</i> , <i>Histoplasma farciminosum</i> , <i>Emmonsia capsulata</i>
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Blastomycoides dermatitidis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida stellatoidea</i> , <i>Candida clausenii</i> , <i>Candida langeroni</i> , <i>Candida stellatoidea</i> , <i>Monilia albicans</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	
<i>Candida glabrata</i>	<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Yamadazyma guilliermondii</i> , <i>Candida melibiosii</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Kluyveromyces cicerisporus</i> , <i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Candida acidothermophilum</i> , <i>Candida castellani</i> , <i>Saccharomyces krusei</i>
<i>Candida lusitanae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i> , <i>Clavispora imtechensis</i>
<i>Candida metapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i> group III
<i>Candida orthopsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i> group II
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Monilia parapsilosis</i>
<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida paratropicalis</i> , <i>Candida vulgaris</i> , <i>Monilia tropicalis</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Coccidioides esteriformis</i> , <i>Blastomycoides immitis</i> , <i>Coccidioides esteriformis</i> , <i>Geotrichum immite</i> , <i>Glenospora metaeuropea</i> , <i>Glenosporium louisianoideum</i> , <i>Posadasia esteriformis</i> , <i>Pseudococcidioides mazzai</i> , <i>Trichosporon proteolyticum</i>
<i>Coccidioides posadasii</i>	
<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Filobasidiella bacillispora</i> , <i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>shanghaiensis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i> , <i>Cryptococcus bacillisporus</i> , <i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>gattii</i> , <i>Filobasidiella bacillispora</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	<i>Filobasidiella neoformans</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i> , <i>Debaryomyces tyrocola</i> var. <i>hansenii</i> , <i>Torulopsis candida</i>
<i>Dipodascus capitatus</i>	<i>Geotrichum capitatum</i> , <i>Blastoschizomyces capitatus</i> , <i>Blastoschizomyces pseudotrichosporon</i> , <i>Trichosporon capitatum</i> , <i>Magnusiomyces capitatus</i>
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Trichophyton cruris</i>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Nectria haematococca</i>
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Absidia corymbifera</i> , <i>Absidia ginsan</i> , <i>Lichtheimia corymbifera</i> , <i>Mycocladius corymbifer</i> , <i>Mycocladius corymbiferus</i> , <i>Absidia ramosa</i> , <i>Absidia ramosa</i> , <i>Mucor corymbifer</i>
<i>Microsporum canis</i>	<i>Arthroderma otae</i> , <i>Nannizzia otae</i> , <i>Microsporum lanosum</i> , <i>Microsporum sapporoense</i>
<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Arthroderma gypseum</i> , <i>Achorion gypseum</i> , <i>Arthroderma incurvatum</i> (teleomorph), <i>Nannizzia gypsea</i> , <i>Gymnoascus gypseus</i>
<i>Mucor plumbeus</i>	
<i>Mucor pusillus</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i>
<i>Mucor racemosus</i>	<i>Rhizomucor racemosus</i>
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Coccidioides brasiliensis</i> , <i>Loboa loboii</i> , <i>Aleurisma brasiliensis</i> , <i>Blastomyces brasiliensis</i> , <i>Coccidioides histosporocellularis</i> , <i>Lutzomyces histosporocellularis</i> , <i>Monilia brasiliensis</i> , <i>Mycoderma brasiliensis</i> , <i>Mycoderma histosporocellularis</i> , <i>Zymonema brasiliensis</i> , <i>Monosporium apiospermum</i>
<i>Penicillium marneffei</i>	
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Pseudallescheria boydii</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i> , <i>Graphium eumorphum</i> , <i>Petriellidium boydii</i> , <i>Pseudallescheria sheari</i> , <i>Allescheria boydii</i> , <i>Scedosporium aurantiacum</i> , <i>Scedosporium dehoogii</i> , <i>Pseudallescheria minutispora</i> , <i>Pseudallescheria ellipsoidea</i> , <i>Pseudallescheria augusta</i> , <i>Polycytella hominis</i>
<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus rhizopodiformis</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Rhizopus tritici</i> , <i>Rhizopus thermosus</i> , <i>Rhizopus tamari</i> , <i>Rhizopus suinus</i> , <i>Rhizopus peka</i> , <i>Rhizopus hangchow</i> , <i>Rhizopus formosaensis</i> , <i>Rhizopus chiuniang</i> , <i>Rhizopus liquefaciens</i> , <i>Rhizopus javanicus</i> , <i>Rhizopus pseudochinensis</i> , <i>Rhizopus batatas</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Rhizopus japonicus</i> , <i>Rhizopus javanicus</i> , <i>Rhizopus kasanensis</i> , <i>Rhizopus maydis</i> , <i>Rhizopus nodosus</i> , <i>Rhizopus tonkinensis</i> , <i>Rhizopus trubinii</i> , <i>Rhizopus usamii</i>

Spezies	Synonyme
<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Trichosporon inkin</i>
<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Sporobolomyces</i> spp., <i>Erythronasidium clade</i> , <i>Occultifur externus</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces oviformis</i> , <i>Saccharomyces italicus</i> , <i>Saccharomyces capensis</i> , <i>Saccharomyces uvarum</i> , <i>Candida robusta</i> , <i>Hormiscium cerevisiae</i> , <i>Mycotorula robusta</i> , <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> , <i>Saccharomyces kudriavzevii</i>
<i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Rhinocladium asteroides</i> , <i>Rhinothrichum beurmannii</i> , <i>Sporothrix. Asteroids</i> , <i>Sporothrix beurmannii</i> , <i>Sporotrichum asteroides</i> , <i>Sporotrichum beurmannii</i> , <i>Sporotrichum councilman</i> , <i>Sporotrichum equi</i> , <i>Sporotrichum fonsecae</i> , <i>Sporotrichum grigsbyi</i> , <i>Sporotrichum indicum</i> , <i>Sporotrichum jeanselmei</i> , <i>Sporotrichum schenckii</i> , <i>Sporotrichum schenckii</i> , <i>Sporotrichum tropicale</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> var. <i>Luriei</i> , <i>Ophiostoma stenoceras</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Arthroderma benhamiae</i> , <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> (teleomorph), <i>Trichophyton erinacei</i> , <i>Trichophyton quinckeanum</i> , <i>Achorion quinckeanum</i> , <i>Trichophyton asteroides</i> , <i>Trichophyton granulare</i> , <i>Trichophyton granulatum</i> , <i>Trichophyton gypseum</i> , <i>Trichophyton niveum</i> , <i>Trichophyton pedis</i> , <i>Trichophyton proliferans</i> , <i>Trichophyton radiolatum</i> , <i>Trichophyton interdigitale</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton purpureum</i> , <i>Sadouraudites ruber</i>
<i>Trichophyton tonsurans</i>	<i>Trichophyton sulphureum</i>
<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Trichosporon coremiformis</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i> var. <i>peneaus</i> , <i>Trichosporon figueiae</i> , <i>Trichosporon loboii</i>
<i>Trichosporon asteroides</i>	
<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Geotrichum cutaneum</i> , <i>Monilia cutanea</i> , <i>Oidium cutaneum</i>
<i>Trichosporon mucoides</i>	<i>Trichosporon beigelii</i>

Sequenzverfügbarkeit aller 56 Spezies und sechs Zielgene/-sequenzen

Tabelle 48: Sequenzverfügbarkeit von 56 Spezies und sechs Zielgene/-sequenzen: *Internal transcribed spacer* (ITS), kleine und große ribosomale Untereinheit (SSU, LSU), Calmodulin (Cal), β -Tubulin (β tub) und Elongationsfaktor 3 (EF-3). Die Anzahl der sequenzierten Einträge ist in Zahlen angegeben. Lag kein Eintrag der jeweiligen Spezies und des Zielgens vor, wurde dies durch - gekennzeichnet.

Spezies	ITS	SSU	LSU	Cal	β tub	EF-3
<i>Absidia caerulea</i>	10	-	-	-	1	-
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	117	-	1	-	1	-
<i>Absidia cylindrospora</i>	2	-	-	-	-	-
<i>Absidia glauca</i>	19	-	-	-	1	-
<i>Absidia spinosa</i>	6	-	-	-	2	-
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	179	16	14	3	1	2
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	12	14	16	1	1	1
<i>Arthroderma gypseum</i>	28	8	4	1	9	1
<i>Arthroderma otae</i>	28	4	4	1	8	1
<i>Aspergillus flavus</i>	17	12	-	52	44	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	26	11	1	59	79	4
<i>Aspergillus niger</i>	135	21	4	25	114	1
<i>Aspergillus terreus</i>	116	8	2	133	132	1
<i>Candida albicans</i>	334	-	14	5	17	1
<i>Candida dubliniensis</i>	72	11	1	1	1	1
<i>Candida famata</i>	214	19	-	-	31	2
<i>Candida glabrata</i>	82	8	2	-	-	2
<i>Candida guilliermondii</i>	174	17	2	2	1	1
<i>Candida kefyr</i>	56	8	1	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	100	9	1	-	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	64	1	5	-	-	2
<i>Candida metapsilosis</i>	43	-	1	-	-	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	55	2	1	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	332	16	1	-	-	-
<i>Candida pulcherrima</i>	19	-	61	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	109	38	3	1	1	2
<i>Coccidioides immitis</i>	6	27	23	1	1	1
<i>Coccidioides posadasii</i>	13	48	47	1	1	1
<i>Cryptococcus gattii</i>	234	-	51	-	2	1
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	426	23	7	-	-	3
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>		2		-	2	3
<i>Dipodascus capitatus</i>	13	-	-	-	-	-
<i>Epidermophyton floccosum</i>	20	1	-	-	7	-
<i>Fusarium solani</i>	271	6	1	1	168	-
<i>Malassezia furfur</i>	87	2	-	-	-	-
<i>Mucor hiemalis</i>	68	3	-	-	5	-
<i>Mucor plumbeus</i>	16	1	-	-	-	-
<i>Mucor pusillus</i>	43	-	-	-	2	-
<i>Mucor racemosus</i>	58	3	3	-	-	-
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	67	20	17	2	1	1
<i>Penicillium marneffei</i>	213	1	-	-	4	-
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	49	3	1	3	1	1
<i>Pseudallescheria boydii</i>	243	5	-	48	115	-
<i>Rhizopus microsporus</i>	120	-	-	-	3	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	314	3	3	-	1	-
<i>Rhizopus stolonifer</i>	19	-	1	-	1	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	44	3	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	275	77	55	2	6	10
<i>Sporothrix schenckii</i>	79	-	-	75	-	-
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	152	7	2	1	4	1
<i>Trichophyton rubrum</i>	77	2	-	2	15	1
<i>Trichophyton tonsurans</i>	58	3	1	-	7	-
<i>Trichosporon asahii</i>	36	3	-	-	-	-
<i>Trichosporon asteroides</i>	9	1	-	-	-	-
<i>Trichosporon cutaneum</i>	5	3	-	-	-	-
<i>Trichosporon mucoides</i>	13	6	-	-	-	-

Gespottete Sonden aller sechs Zielgene/-sequenzen

Tabelle 49: Gespottete Sonden aller Zielgene. Gelistet sind die zu identifizierenden Spezies, das Zielgen in der sich die Sonde befand, Sondenname und –sequenz, Länge der Sonden anhand der Anzahl der Basenpaare (bp), Gehalt an G- und C-Nukleotiden (GC) und die Schmelztempertaur der Sonden (Tmp). Die Sonden des finalen Mikroarrays sind mit * gekennzeichnet. Die Schmelztemperaturen von Sonden mit degenerierten Basen (M, R, Y und K) entsprechen dem Mittelwert der berechneten Temperaturen der Sonden mit den jeweiligen Basen. Kleinbuchstaben deuten an, dass die Sonde um weitere Basen verlängert wurde.

Spezies	Zielgen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>A. caerulea</i>	ITS	G953_Abs_caer_ITS*	CGGACCCTGGATATTTTTAGCCCC	24	54,2	59,5
		G954_Abs_caer_ITS_rc*	GGGGCTAAAAATATCCAGGGTCCG	24	54,2	59,5
<i>L. corymbifera</i>	LSU	G959_Abs_cory_28S	CACTAAGGCTTCGTCTAGTGG	21	52,4	54,7
		G960_Abs_cory_28S_rc	CCACTAGACGAAGCCTTAGTG	21	52,4	54,7
		G957_Abs_cory_ITS	GACTTGTGCCACTAAGATCTAGGC	24	50	57,1
	ITS	G958_Abs_cory_ITS_rc	GCCTAGATCTTAGTGGCACAAGTC	24	50	57,1
		I732_Abs_coryG_ITS	CGCCTAGTAGTCAATCTACTAGGC	24	50	56
		I733_Abs_coryG_ITS_rc	GCCTAGTAGATTGACTACTAGGCG	24	50	56
		L722_AcoryG_Lä_ITS	gCGCCTAGTAGTCAATCTACTAGGCacag	29	51,7	61,2
		L723_AcoryG_Lä_ITS_rc	ctgtGCCTAGTAGATTGACTACTAGGCGc	29	51,7	61,2
		L724_AcoryG2_ITS_rc	GAACGCATCTTGCCTAGTAGTC	25	52	60,7
		L725_AcoryG2_ITS_rc	GACTACTAGGCGCAAGATGCGTTC	25	52	60,7
		M887_LichCory_ITS2	TCTTGCCTAGTAGTcaatctact	25	44	57,1
		M888_LichCory_ITS2_rc	agtagattGACTACTAGGCGCAAGA	25	44	57,1
		M889_LichCory_ITS4	AAGTGCATAATTATTGCGACTTGCATTCATAG	33	36,4	59,2
		M890_LichCory_ITS4_rc	CTATGAATGCAAGTCGCAATAATTATCGCACTT	33	36,4	59,2
		M885_LichCory_ITS1*	GCATCTTGCCTAGTAGTcaatctactagg	31	48,4	60,9
M886_LichCory_ITS_rc*	cctagtagattGACTACTAGGCGCAAGATGC	31	48,4	60,9		
<i>A. cylindrospora</i>	ITS	G955_Abs_cyli_ITS	CTGGCATCCCTCTTTAGAGTTGC	23	52,2	57,7
		G956_Abs_cyli_ITS_rc	GCAACTTAAAGAGGGATGCCAG	23	52,2	57,7
		L720_Acyl_ITS	ATCCGCCCTGGGCATGGCTATTTTT	25	52	63,3
		L721_Acyl_ITS_rc	AAAAATAGCCATGCCCAGGGCGGAT	25	52	63,3
		L718_Abs_cyli_Lä_ITS*	gctCTGGCATCCCTCTTTAGAGTTGcttc	29	51,7	62,2
L719_Abs_cyli_Lä_ITS_rc*	gaaGCAACTCTAAAGAGGGATGCCAGagc	29	51,7	62,2		
<i>A. glauca</i>	ITS	G961_Abs_glau_ITS	GCTGGAAACTTTTGACATCTCCGC	24	50	58,7
		G962_Abs_glau_ITS_rc	GCGGAGATGTCAAAAGTTCCAGC	24	50	58,7
		L726_Abs_glau_Lä_ITS*	ccGCTGGAAACTTTTGACATCTCCGCc	27	55,6	63,6
		L727_Abs_glau_Lä_ITS_rc*	gGCGGAGATGTCAAAAGTTCCAGCg	27	55,6	63,6
<i>A. spinosa</i>	ITS	G963_Abs_spin_ITS	GTGCACTGTCTACGTTGTGCGTG	23	56,5	60,6
		G964_Abs_spin_ITS_rc	CACGCACAAACGTAGACAGTGCAC	23	56,5	60,6
		I779_Abs_spin2_ITS	GTGCACTGTTGTTTGGTGTGGG	23	52,2	59,5
		I786_Abs_spin2_ITS	CCCACACAAACAACAGTGCAC	23	52,2	59,5
		L728_Aspin_ITS*	ACGCATCTTGACCCCYTGGGTATTC	25	56	62,3
		L729_Aspin_ITS_rc*	GAATACCCARGGGTGAAGATGCGT	25	56	62,3
<i>A. capsulatus</i>	ITS	G965_Ajell_caps_ITS	CCTGTCTACCGACCTGTTGC	22	59,1	59,9
		G966_Ajell_caps_ITS_rc	GCAACAGGTCCGGTAGACAAGG	22	59,1	59,9
		L730_Ajell_caps_Lä_ITS	ccacCCTGTCTACCGACCTGTTGcctcg	30	63,3	67,9
		L731_Ajell_caps_Lä_ITS_rc	cgagGCAACAGGTCCGGTAGACAAGGgtg	30	63,3	67,9
	LSU	L736_AjCap_28S	CGTCAATCCCCCGGCCG	20	80	69,3
		L737_AjCap_28S_rc	CGGCCGCGGGGATTGCACG	20	80	69,3
		L738_AjCapLä_28S	CCCGTGAATCCCCCGGCCGGGC	25	84	76,1
	SSU	L739_AjCapLä_28S_rc	GCCCCGCCGCGGGGATTGCACGGG	25	84	76,1
		L732_AjCap_18S	CTCCTGGGGAGCCTCATGGCCTT	23	65,2	65,3
		L733_AjCap_18S_rc	AAGGCCATGAGGCTCCCCAGGAG	23	65,2	65,3
<i>Ajellomyces spp.</i>	SSU	L734_AjCap2_18S	ACCTTCTCTGCGGGAGCCT	21	61,9	62,7
		L735_AjCap2_18S_rc	AGGCTCCCCAGGAGGAAAGGT	21	61,9	62,7
		L748_AjDer+cap_18S	GACCTTTCCTCTGGGAAGCC	21	61,9	59,9
		L749_AjDer+cap_18S_rc	GGCTTCCCAGGAGGAAAGGTC	21	61,9	59,9
<i>A. dermatitidis</i>	Cal	G969_Ajell_derm_Cal	CACAGTTTACCCCCCTCGAAACTG	24	54,2	59,6
		G970_Ajell_derm_Cal_rc	CAGTTTCAGGGGGTAAACTGTG	24	54,2	59,6
	LSU	L744_AjDer_28S	CCGGCCGGCTTCGCCCATGT	20	75	68,3
		L745_AjDer_28S_rc	ACATGGGCGAAGCCGGCCGG	20	75	68,3

Spezies	Zielgen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>A. dermatitidis</i>	LSU	L746_AjDer2_28S	CACTCCCCACGGGCGGGCC	20	85	71
		L747_AjDer2_28S_rc	GGCCCCCGCGTGGGGGAGTG	20	85	71
	SSU	L742_AjDer_18S	CCATGGCCTTTACTGGCTGTG	21	57,1	58,6
		L743_AjDer_18S_rc	CACAGCCAGTAAAGGCCATGG	21	57,1	58,6
	ITS	G967_Ajell_derm_ITS	CCCATCTCAAACCTTCGAGGG	22	59,1	59,7
		G968_Ajell_derm_ITS_rc	CCCTCGAAGGGTTGAGATGGG	22	59,1	59,7
		M793_Aderm2_Lä_ITS	ggACACCCGTAGAACTTCTGGTGAACGATTGAca	34	50	64,9
		M794_Aderm2_Lä_ITS_rc	tgTCAATCGTTCACCAGAAGTTCTAGCGGTGTcc	34	50	64,9
L740_Aderm2_ITS*		ACACCCGTAGAACTTCTGGTGAACGATTGA	30	46,7	62,5	
L741_Aderm2_ITS_rc*	TCAATCGTTCACCAGAAGTTCTAGCGGTGT	30	46,7	62,5		
<i>A. gypseum</i>	LSU	H038_Mic_gyps_28S	CTTCCCTACAATCAGGTTGACC	22	50	55,2
		H039_Mic_gyps_28S_rc	GGTCAACCTGATTGTAGGGAAG	22	50	55,2
		L766_Agyp_28S	CTGGCCCTACGGGGGTTCC	20	75	64,5
		L767_Agyp_28S_rc	GGACCCCCGTAGGAGGCCAG	20	75	64,5
	ITS	L762_Agyp_ITS	GAGGAGTGATTAATAATCCATgaaTac	26	34,6	51,9
		L763_Agyp_ITS_rc	gtAttcATGGATTTAATCACTCCTC	26	34,6	51,9
		L764_Agyp_Lä_ITS	GAGGAGTGATTAATAATCCATgaaTacTGTT	30	33,3	55,4
		L765_Agyp_Lä_ITS_rc	AACAgTAttcATGGATTTAATCACTCCTC	30	33,3	55,4
		M795_Agyp_NoLä_ITS*	GAGGAGTGATTAATAATCCATgaaTacTGTtccg	33	39,4	58,7
		M796_Agyp_NoLä_ITS_rc*	cggAACAgTAttcATGGATTTAATCACTCCTC	33	39,4	58,7
<i>Arthroderma</i> spp.	LSU	L768_Agyp+ota_28S	CACTCCCCGTCTCCCGGGCC	20	80	67,5
		L769_Agyp+ota_28S_rc	GGCCCCGGGAGACGGGGAGTG	20	80	67,5
<i>A. otae</i>	LSU	H036_Mic_cani_28S	GGGATAGTTAGGTTCCCCCTCC	22	59,1	58,5
		H037_Mic_cani_28S_rc	GGAGGGGGAACCTAACTATCCC	22	59,1	58,5
		L754_Aotae_28S	ACTCCCCGTCCCCCGGGCC	20	85	72
		L755_Aotae_28S_rc	GGCCCCGGGGGACGGGGAGT	20	85	72
		L756_Aotae2_28S	CCTCCCTTGGGGGGTCCGAG	20	75	64,6
		L757_Aotae2_28S_rc	CTCGGACCCCCAAGGGAGG	20	75	64,6
	SSU	L750_Aotae_18S	TCCGGGCTTTCTGGTGATT	20	55	59,1
		L751_Aotae_18S_rc	AATCACAGAAAGCCCCGGA	20	55	59,1
		L752_Aotae2_18S	TGGCCGTGGGTGGAACCAGG	20	70	65,1
	ITS	L753_Aotae2_18S_rc	CCTGGTCCACCCACGGCCA	20	70	65,1
		L758_Aotae_ITS	GTAACCACCCACCGCTTAGGGG	22	63,6	62
		L759_Aotae_ITS_rc	CCCCTAAGCGGTGGGTGGTTAC	22	63,6	62
		L760_Aotae_Lä_ITS	CTCCCCAGTAACCCACCCCGCTTAG	26	61,5	64,3
		L761_Aotae_Lä_ITS_rc	CTAAGCGGTGGGTGGTTACTGGGGAG	26	61,5	64,3
		M797_ArOta_ITS1	ATTCTGTCTACTGACCCGGTTGCCT	26	50	61,6
		M798_ArOta_ITS1_rc	AGGCAACCGGGTCAGTAGACAAGAAT	26	50	61,6
		M801_ArOta_ITS3	GTTCCGGGGGGGACGCCTGAGGGGGAC	26	76,9	71,9
		M802_ArOta_ITS3_rc	GTCCCCCTCAGGCGTCCCCCGAAC	26	76,9	71,9
<i>A. flavus</i>	EF-3	G971_Asp_flav_EF-3	CTGAAGCTCGCTGAAGATCTCAAG	24	50	57,4
		G972_Asp_flav_EF-3_rc	CTTGAGATCTTCAGCGAGCTTCAG	24	50	57,4
	SSU	L774_AsFlavG_18S	ACTGGCCAGGAGGGTTGGC	20	70	65,1
		L775_AsFlavG_18S_rc	GCCAACCTCCTGGGCCAGT	20	70	65,1
	ITS	L770_AflavG_ITS	gccGAACGCAAATCAATCTTTT	22	40,9	54,9
		L771_AflavG_ITS_rc	AAAAGATTGATTTGCGTTCggc	22	40,9	54,9
L772_AflavG_Lä_ITS*		gcgcttggcGAACGCAAATCAATCTTTT	29	46,4	62,6	
L773_AflavG_Lä_ITS_rc*	AAAAGATTGATTTGCGTTCggcaagcgc	29	46,4	62,6		
<i>A. fumigatus</i>	ITS	G973_Asp_fumi_ITS	CTTTGTACCTGCTCTGTAGGCC	23	56,5	59,8
		G974_Asp_fumi_ITS_rc	GGCCTACAGAGCAGGTGACAAAG	23	56,5	59,8
		M803_AfumiNeu_Lä_ITS	gtaTGGGGCTTTGTACCTGTCTGTAGGCCGgcc	36	63,9	71,3
		M804_AfumiNeu_Lä_ITS_rc	ggcCGGGCTACAGAGCAGGTGACAAAGCCCCAtac	36	63,9	71,3
		L776_Asp_fumi_Lä_ITS*	tggggCTTTGTACCTGCTCTGTAGGCCc	29	62,1	68,4
		L777_Asp_fumi_Lä_ITS_rc*	gGGCCTACAGAGCAGGTGACAAAGcccca	29	62,1	68,4
	Cal	M815_Afumi_Cal_1_Lä	tatgAACTCGGGAGGGGAGAGAACAATCAttaa	33	42,4	61,4
		M816_Afumi_Cal_1_Lä_rc	ttaaTGATTGTTCTCTCCCTCCCGAGTTcata	33	42,4	61,4
		M817_Afumi_Cal_2	ATACTTTCGGTATGAACCTGGGAGGGGAGA	30	50	63
		M818_Afumi_Cal_2_rc	TCTCCCCCTCCGAGTTCATACCGAAAGTAT	30	50	63
M819_Afumi_Cal_3	GTATGAACCTCGGGAGGGGAGAGAACAATCA	30	50	62,2		
M820_Afumi_Cal_3_rc	TGATTGTTCTCTCCCTCCCGAGTTCATAC	30	50	62,2		

Spezies	Ziel-gen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>A. fumigatus</i>	Cal	M821_Afumi_Cal_5	CCGACTCACAAATATCCGGAAATGACCCGTC	30	53,3	63,3
		M822_Afumi_Cal_5_rc	GACGGGTCATTTCCGGATATTGTGAGTCGG	30	53,3	63,3
	Btub	M805_Afumi_1_Lä_Btub	catcAGACACGCGTCCGCTTCTCCTTGtttc	33	51,5	64,9
		M806_Afumi_1_Lä_Btub_rc	gaaaACAAGGAAGAAGCGGACGCGTGTctgatg	33	51,5	64,9
		M807_Afumi_2_Lä_Btub	ctattATTTCCATCAGACACGCGTCCGCTtcttc	35	48,6	63,8
		M808_Afumi_2_Lä_Btub_rc	gaagaAGCGGACGCGTGTCTGATGGGAAAtaataag	35	48,6	63,8
		M809_Afumi_3_Lä_Btub	gacaCGCGTCCGCTTCTCCTTGTTTTCCgtgt	33	54,5	67,3
		M810_Afumi_3_Lä_Btub_rc	acacGGAAAACAAGGAAGAAGCGGACGCGgtgtc	33	54,5	67,3
		M811_Afumi_4_Lä_Btub	attaATTTCCATCAGACACGCGTCCGCTTcttc	33	48,5	64,2
		M812_Afumi_4_Lä_Btub_rc	gaagAAGCGGACGCGTGTCTGATGGGAAAtaat	33	48,5	64,2
M813_Afumi_5_Lä_Btub	acatATTTGCACCGTTGGCCTAGTAGCGagtc	33	48,5	63,6		
M814_Afumi_5_Lä_Btub_rc	gactCGCTACTAGGCCAACGGTGACAAAtatgt	33	48,5	63,6		
<i>A. niger</i>	EF-3	G977_Asp_nige_EF-3	CGTCCTGTGAATTTTCCAGACGC	24	50	58,6
		G978_Asp_nige_EF-3_rc	GCGTCTGGAAAAATTCACAGGACG	24	50	58,6
	LSU	L782_Asnig_18S	TTCGGGGAAATCTCATGGCC	20	55	57,1
		L783_Asnig_18S_rc	GGCCATGAGATTCGCCAGAA	20	55	57,1
	ITS	L778_AnigG ITS	CCTGCCGAGTTTTCCAACCATT	23	52,2	60,4
		L779_AnigG ITS_rc	AATGGTTGGAAAACGTCGGCAGG	23	52,2	60,4
		L780_AnigG_Lä ITS*	ggcgCCTGCCGACGTTTTCCAACCATT	27	59,3	67,3
L781_AnigG_Lä ITS_rc*	AATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGcgcc	27	59,3	67,3		
<i>A. terreus</i>	Btub	G981_Asp_terre_btub	CAAGAACCTGAGCGTCTCCTCG	22	59,1	59,5
		G982_Asp_terre_btub_rc	CGAGGAGACGCTCAGGTTCTTG	22	59,1	59,5
	EF-3	G983_Asp_terre_EF-3	CAAGGAAGTCCCACCGAAGTTAC	24	54,2	59,4
		G984_Asp_terre_EF-3_rc	GTAAGTTCGGTGGGACCTTCCTTG	24	54,2	59,4
	Cal	G979_Asp_terre_Cal	CCTGGTACGTTCCGTTCTACACG	23	56,5	59,2
		G980_Asp_terre_Cal_rc	CGTGTAGAACGGAACGTACCAGG	23	56,5	59,2
	ITS	L784_AterG_PM ITS	GTCTGAGTTGTGATTCTTTGCA	22	40,9	53,4
		L785_AterG_PM ITS_rc	TGCAAAGAATCACAACCTCAGAC	22	40,9	53,4
		L786_AterG_PM_Lä ITS	CTTGCACTGAGTTGTGATTCTTTGCAAT	30	40	59,6
		L787_AterG_PM_Lä ITS_rc	ATTGCAAAGAATCACAACCTCAGACTGCAAG	30	40	59,6
		M823_AterrG+SYN ITS	aagCTTGCACTGAGTTGTGATTCTTTGCAATcag	36	41,7	63,1
		M824_AterrG+SYN ITS_rc	ctgATTGCAAAGAATCACAACCTCAGACTGCAAGcct	36	41,7	63,1
		M825_AterrG+SYN+Lä ITS	GCTTGCACTGAGTGTGATTCT	20	50	56,2
		M826_AterrG+SYN+Lä ITS_rc	GAATCACACTCAGACTGCAAGC	20	50	56,2
		M828_ATerG_NoLä ITS*	AAGCTTGCACTGAGTGTGATTCTTTGCA	30	43,3	62
	M827_ATerG_NoLä ITS_rc*	TGCAAAGAATCACAACCTCAGACTGCAAGCTT	30	43,3	62	
	<i>C. albicans</i>	LSU	G987_Can_albi_28S	CCGTGATTGCTGTTTTGACGC	20	52,4
G988_Can_albi_28S_rc			GCGTCAAAACAGCAATCACGG	20	52,4	57,6
EF-3		G989_Can_albi_EF-3	CAACCAACGGTTATCCCCATCC	23	52,2	58,2
		G990_Can_albi_EF-3_rc	GGATGGGGATAAACCGTTGGTTG	23	52,2	58,2
ITS		G985_Can_albi ITS*	GAAAGACGGTAGTGGTAAGCGC	22	54,5	57,5
	G986_Can_albi ITS_rc*	CGCCTTACCCTACCGTCTTTC	22	54,5	57,5	
<i>C. dubliniensis</i>	ITS	G991_Can_dubl ITSneu	GATAGTGGTATAAGGCGGAG	20	50	51,8
		G992_Can_dubl ITSneu_rc	CTCCGCCTTATACCACTATC	20	50	51,8
		L788_Can_dubl_Lä ITS*	gatGATAGTGGTATAAGGCGGAGatgc	27	48,1	58,5
		L789_Can_dubl_Lä ITS_rc*	gcatCTCCGCCTTATACCACTATCcatc	27	48,1	58,5
<i>C. famata</i>	Btub	G993_Can_fama_btub	GATTGGCGGAGGAATCGTCC	20	60	58,2
		G994_Can_fama_btub_rc	GGACGATTCCTCCGCCAATC	20	60	58,2
	SSU	L794_Cfam_18S	TGGCTAACCTTTCGCCCTTG	20	55	57,9
		L795_Cfam_18S_rc	CAAGGGCGAAAGGTTAGCCA	20	55	57,9
		L796_Cfam2_18S	GACGGAGCCAACGAGTATTA	20	50	54,1
		L797_Cfam2_18S_rc	TAATACTCGTTGGCTCCGTC	20	50	54,1
	ITS	L790_Cfam ITS	GGTCTGGACTAGAAATAGTTTGG	23	43,5	52,7
		L791_Cfam ITS_rc	CCAAACTATTTCTAGTCCAGACC	23	43,5	52,7
L792_Cfam_Lä ITS*		tttGGTCTGGACTAGAAATAGTTTGGgcc	29	44,8	60,1	
L793_Cfam_Lä ITS_rc*	ggcCCAAACTATTTCTAGTCCAGACCaaa	29	44,8	60,1		
<i>C. glabrata</i>	ITS	G995_Can_glab ITS	GTTGGTGGGTGTTCTGCAGTG	21	57,1	58,9
		G996_Can_glab ITS_rc	CACTGCAGAACACCCACCAAC	21	57,1	58,9
		I738_C_glab ITS*	GTAGGCCATATCAGTATGTGGGAC	24	50	56,7
		I739_C_glab ITS_rc*	GTCCACATACTGATATGGCCTAC	24	50	56,7
<i>C. guil-liermondii</i>	LSU	H008_Can_guil_28S	CAACTCGTTGAATGGTGTGGCG	22	54,5	59,1
		H009_Can_guil_28S_rc	CGCCACACCATCAACGAGTTG	22	54,5	59,1

Spezies	Zielgen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp	
<i>C. guil-liermondii</i>	EF-3	H010 Can_guil_EF-3	CATTGCATCGTTCTCAACTCCTC	24	50	57,9	
		H011 Can_guil_EF-3_rc	GAGGAGTTGAGGAACGATGCAATG	24	50	57,9	
	ITS	I734_C_guilG ITS*	GGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGG	24	54,2	59	
		I735_C_guilG ITS_rc*	CCCAACTATCTCTAGGCCAAACC	24	54,2	59	
<i>C. kefyf</i>	ITS	G997_Can_kefyf ITS*	CTGGGGGAATCGTCTGAACAAGG	23	56,5	59,6	
		G998_Can_kefyf ITS_rc*	CCTGTTCAGACGATTCCCCCAG	23	56,5	59,6	
<i>C. krusei</i>	ITS	I740_C_krusei ITS*	GAGCGGAACGAAAAACAACAACACC	24	50	59,1	
		I741_C_krusei ITS_rc*	GGTGTGTGTTTTCTGTTCCGCTC	24	50	59,1	
<i>C. lusitaniae</i>	ITS	G999 Can_lusi ITS	GCGCTGTCAAACACGTTTACAGC	23	52,2	59,4	
		H001 Can_lusi ITS_rc	GCTGTAAACGTGTTTACAGCGC	23	52,2	59,4	
		L800_Can_lusiG2 ITS	GCGTCGCATCCCCTCTAACCC	21	66,7	62,5	
		L801_Can_lusiG2 ITS_rc	GGGTTAGAGGGGATGCGACGC	21	66,7	62,5	
		L802_Can_lusiG2_Lä ITS	gtttgaGCGTCGCATCCCCCTCTAACCC	27	59,3	64,5	
		L803_Can_lusiG2_Lä ITS_rc	GGGTTAGAGGGGATGCGACGCtcaaac	27	59,3	64,5	
		L798_Can_lusiG_Lä ITS*	caaccGCGCTGTCAAACACGTTTACAGCaccgac	33	54,5	66,7	
		L799_Can_lusiG_Lä ITS_rc*	gtcgtGCTGTAAACGTGTTTACAGCGCggttg	33	54,5	66,7	
	LSU	L804_Clusi_28S	AAGGTTTCGTGGTCTGAGTC	20	50	54,6	
		L805_Clusi_28S_rc	GACTCAGACCACGAAACCTT	20	50	54,6	
		L806_Clusi2_28S	AATGTGGCGCGCACCTTCGG	20	65	63,8	
		L807_Clusi2_28S_rc	CCGAAGGTGCGCGCCACATT	20	65	63,8	
	<i>C. metapsilosis</i>	ITS	H002 Can_meta ITS	CGCTTAACTGCGACCCTTTTC	21	52,4	56,6
			H003 Can_meta ITS_rc	GAAAAGGGTCCGAGTTAAGCG	21	52,4	56,6
I742 C_MetaG ITS			CACGGCCTGCCAGAGATTAACCTC	24	54,2	59,8	
I743 C_MetaG ITS_rc			GAGTTAATCTCTGGCAGGCCGTG	24	54,2	59,8	
M829_CandMeta ITS1			TTTGGTGGGCCCCAGGCCCTGCCAGAGA	27	66,7	71,3	
M830_CandMeta ITS1_rc			TCTTGGCAGGCCCTGGGCCCCACCAAA	27	66,7	71,3	
M831_CandMeta ITS2			TGGTGGGCCCCAGGCCCTGCCAGAGAT	26	69,2	71,6	
M832_CandMeta ITS2_rc			ATCTCTGGCAGGCCCTGGGCCCCACCA	26	69,2	71,6	
<i>C. metapsilosis, C. orthopsilosis</i>	ITS	L808_C_meta+ortho ITS	GGGCCAYGGCCTGCCAGAGATTAACCTC	29	62,1	66,6	
		L809_C_meta+ortho ITS_rc	GAGTTAATCTCTGGCAGGCCRTGGGCC	29	62,1	66,6	
		M837_CandMeta+Ortho ITS1	TTTGGTGGGCCCCAYGGCCTGCCAGAGA	27	66,7	70,4	
		M838_CandMeta+Ortho ITS1_rc	TCTTGGCAGGCCRTGGGCCCCACCAAA	27	66,7	70,4	
		M839_CandMeta+Ortho ITS2	TTTGGTGGGCCCCAYGGCCTGCCAGAGATTA	30	60	68,8	
		M840_CandMeta+Ortho ITS2_rc	TAATCTCTGGCAGGCCRTGGGCCCCACCAAA	30	60	68,8	
		M833_CandOrtho ITS1*	TTTGGTGGGCCCCATGGCCTGCCAGAGA	27	63	69,6	
		M834_CandOrtho ITS1_rc*	TCTTGGCAGGCCATGGGCCCCACCAAA	27	63	69,6	
<i>C. orthopsilosis</i>	LSU	H004 Can_orth_28S	GGGCGGTAGGACAATTGCAAAG	22	54,5	58,9	
		H005 Can_orth_28S_rc	CTTTGCAATTGTCTACCGCCC	22	54,5	58,9	
	ITS	I736 C_orthoG ITS	CCCATGGCCTGCCAGAGATTAAC	24	54,2	60,1	
		I737 C_orthoG ITS_rc	GTTTAATCTCTGGCAGGCCATGGG	24	54,2	60,1	
		M835_CandOrtho ITS2	TGGTGGGCCCCATGGCCTGCCAGAGAT	26	65,4	69,9	
M836_CandOrtho ITS2_rc	ATCTCTGGCAGGCCATGGGCCCCACCA	26	65,4	69,9			
<i>C. parapsilosis</i>	ITS	H006 Can_para ITS	GTAGGCCTTCTATATGGGGCCTG	23	56,5	58,8	
		H007 Can_para ITS_rc	CAGGCCCATATAGAAGGCCTAC	23	56,5	58,8	
		L810_Can_para_Lä ITS	GGTAGGCCTTCTATATGGGGCCTGCCAGAG	30	60	66	
		L811_Can_para_Lä ITS_rc	CTCTGGCAGGCCCATATAGAAGGCCTACC	30	60	66	
		L812_Can_para2 ITS	AACTCCAAAACCTCTCCAAATTCGACCTC	30	40	59,1	
		L813_Can_para2 ITS_rc	GAGGTCGAATTTGGAAGAAGTTTTGGAGTT	30	40	59,1	
		L814_Can_para2_Lä ITS	ggtacaAACTCCAAAACCTCTTCCAAATTC	30	36,7	56,8	
		L815_Can_para2_Lä ITS_rc	GAATTTGGAAGAAGTTTTGGAGTTgtacc	30	36,7	56,8	
		M843_Cpara ITS2	TTTGGTAGGCCTTCTATATGGGGCCTGCCA	30	53,3	65,7	
		M844_Cpara ITS2_rc	TGGCAGGCCCATATAGAAGGCCTACCAAA	30	53,3	65,7	
		M845_Cpara ITS3	TTGGTAGGCCTTCTATATGGGGCCTGCCAG	30	56,7	65,9	
		M846_Cpara ITS3_rc	CTGGCAGGCCCATATAGAAGGCCTACCAA	30	56,7	65,9	
		M847_Cpara ITS4	TGGTAGGCCTTCTATATGGGGCCTGCCAGA	30	56,7	66,7	
		M848_Cpara ITS4_rc	TCTGGCAGGCCCATATAGAAGGCCTACCA	30	56,7	66,7	
		M841_Cpara ITS1*	GGCCTTCTATATGGGGCCTGCCAGAGATTA	30	53,3	64,1	
	M842_Cpara ITS1_rc*	TAATCTCTGGCAGGCCCATATAGAAGGCC	30	53,3	64,1		
	SSU	L816_Cpara_18S	TGGCTAGCCTTTTTGGCGAACCAGG	25	56	63,7	
		L817_Cpara_18S_rc	CCTGGTTCGCCAAAAGGCTAGCCA	25	56	63,7	
		L818_CparaLä_18S	TTCTGGCTAGCCTTTTTGGCGAACCAGGAC	30	53,3	65,3	
		L819_CparaLä_18S_rc	GTCCTGGTTCGCCAAAAGGCTAGCCAGAA	30	53,3	65,3	

Spezies	Ziel-gen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>C. pulcher- rima</i>	LSU	L824_Cpul_28S	AGCAAACCACCGGGGAATG	20	55	58,5
		L825_Cpul_28S_rc	CATCCCCGGTGGTTTTGCT	20	55	58,5
		L826_Cpul2_28S	TTCGAGGATTATAACCCCCGGCC	23	56,5	60,8
		L827_Cpul2_28S_rc	GGGCCGGGGTTATAATCCTCGAA	23	56,5	60,8
	ITS	L820_C_pulG ITS	CCTCACCCCTCGTAAGACTACCCGCTGAACT	30	56,7	65,2
		L821_C_pulG ITS_RC	AGTTCAGCGGGTAGTCTTACGAGGGTGAGG	30	56,7	65,2
		L822_C_pulG2 ITS*	GCTTCGGCCTAATCAACGGCGCTAGAAT	30	50	63,3
L823_C_pulG2 ITS_rc*	ATTCTAGCGCCGTTGATATTAGGCCGAAGC	30	50	63,3		
<i>C. tropi- calis</i>	LSU	H014 Can_trop_28S	CGCTTATTTTGTAGTGGCCACC	23	52,2	58,7
		H015 Can_trop_28S_rc	GGTGGCCACTAGCAAAATAAGCG	23	52,2	58,7
	SSU	L832_Ctrop_18S	CGGTCCATCTTTCTGATGCGTACTG	25	52	59,4
		L833_Ctrop_18S_rc	CAGTACGCATCAGAAAGATGGACCG	25	52	59,4
	ITS	H012 Can_trop ITS	CAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGC	23	52,2	59,4
		H013 Can_trop ITS_rc	GCTCCCGCCACCAAGAAATTTG	23	52,2	59,4
		L828_Can_tropG ITS	CGGGAGCAATCCTACC GCCAGAGGTTATAA	30	53,3	64,1
		L829_Can_tropG ITS_rc	TTATAACCTCTGGCGGTAGGATTGCTCCCG	30	53,3	64,1
		L830_Can_trop_Lä ITS*	gaaCAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGCaatcc	31	48,4	63,3
L831_Can_trop_Lä ITS_rc*	ggattGCTCCCGCCACCAAGAAATTTGttc	31	48,4	63,3		
<i>C. immitis</i>	ITS	H016 Coc_immi ITS	CGCTGCCAGTGGATCAATTG	21	57,1	59,1
		H017 Coc_immi ITS_rc	CAATTGATCCACTGGCAGGCG	21	57,1	59,1
		L834_Coc_immi_Lä ITS	CGCGCGCTGCCAGTGGATCAATTGAACT	29	58,6	67,7
		L835_Coc_immi_Lä ITS_rc	AGTTCAATTGATCCACTGGCAGGCGCGCG	29	58,6	67,7
<i>C. posada- sii</i>	ITS	H018 Coc_posa ITS	CCTGCCAGCGGATCAATTGAAC	22	54,5	58,9
		H019 Coc_posa ITS_rc	GTTCAAATTGATCCGCTGGCAGG	22	54,5	58,9
		L836_Coc_posa_Lä ITS	CGCGCCTGCCAGCGGATCAATTGAA	25	60	66
		L837_Coc_posa_Lä ITS_rc	TTCAATTGATCCGCTGGCAGGCGCG	25	60	66
<i>C. immitis, C. posada- sii</i>	LSU	L846_Cocl+P_28S	ACCAGACTCGGTCTGGGGG	20	70	63,9
		L847_Cocl+P_28S_rc	CCCCCAGCAGCGAGTCTGGT	20	70	63,9
		L848_Cocl+P2_28S	CGTCTTTGGCTGCTGGACCG	20	65	61,3
		L849_Cocl+P2_28S_rc	CGGTCCAGCAGCCAAAGACG	20	65	61,3
	SSU	L842_Coccl+P_18S	AGCCCCACCCACGTTTGTGG	20	65	63
		L843_Coccl+P_18S_rc	CCACAACCGTGGTTCGGGCT	20	65	63
		L844_Coccl+P2_18S	TCTGGGAACCTATGGCTTCACT	25	56	63,4
		L845_Coccl+P2_18S_rc	AGTGAAGGCCATAGGGTTCCCCAGA	25	56	63,4
	ITS	L838_CocGenus ITS	ATTGTTGCCTTGGCAGGCTGCCGG	25	64	68,3
		L839_CocGenus ITS_rc	CCGGCAGGCCTGCCAAGGCAACAAT	25	64	68,3
		M849_CocGenus2_Lä ITS	gtCATTGCAAACCTTCAAGCACGGCTtg	29	51,7	63,9
		M850_CocGenus2_Lä ITS_rc	caAGCCGTGCTTGAAGGTTTGAATGac	29	51,7	63,9
		M851_CocSpp ITS1	gcgtCATTGCAAACCTTCAAGCACGGCTtgtg	33	54,5	67,3
		M852_CocSpp ITS1_rc	cacaAGCCGTGCTTGAAGGTTTGAATGacgc	33	54,5	67,3
		M853_CocSpp ITS2	AACGTCCCCGCTTGTGTGGACGGCCTGAA	30	63,3	71
		M854_CocSpp ITS2_rc	TTCAGGCCCTCCACACAAGCGGGGACGTT	30	63,3	71
		M855_CocSpp ITS3	ACCGAGTTCCTGGTGTCTGAGTGTATGGGA	30	53,3	64,9
		M856_CocSpp ITS3_rc	TCCCATACTCAGACACCAGGAACCTGGT	30	53,3	64,9
		L840_CocGenus2 ITS*	CATTGCAAACCTTCAAGCACGGCT	25	52	62,6
		L841_CocGenus2 ITS_rc*	AGCCGTGCTTGAAGGTTTGAATG	25	52	62,6
<i>C. gattii, C. neo- formans</i>	ITS	M857_CryptoGattii_28S_2	gGGGTAGTCTTCGGCTTCTGATAACaacc	30	53,3	63,6
		M858_CryptoGattii_28S_2_rc	ggttGTTATCAGCAAGCCGAAGACTACCCc	30	53,3	63,6
		M859_CryptoGattii_Lä_28S_2	ggaaGGTGATTACCTGTGACGCCGGCGTA	29	58,6	66,3
		M860_CryptoGattii_Lä_28S_2_rc	TACGCCGGGCTGACAGGTAATCACttcc	29	58,6	66,3
<i>C. gattii</i>	SSU	H020 Cry_gatt_18S	GGCTGGTCGTATGACTTCTTAG	22	50	54,8
		H021 Cry_gatt_18S_rc	CTAAGAAGTCATACGACCAGCC	22	50	54,8
	EF-3	H022 Cry_gatt_EF-3	CTATCTCACCTCTCACCCGATG	24	54,2	57,9
		H023 Cry_gatt_EF-3_rc	CATCGGGTGAGAGAGGTGAGATAG	24	54,2	57,9
	LSU	L850_CryGat_28S	GTTCAGCCAGCTCTGCTGGT	20	60	60,2
		L851_CryGat_28S_rc	ACCAGCAGAGCTGGCTGAAC	20	60	60,2
L852_CryGatLä_28S		GGTTCAGCCAGCTCTGCTGGTGT	23	60,9	63,8	
L853_CryGatLä_28S_rc	ACACCAGCAGAGCTGGCTGAACC	23	60,9	63,8		
<i>C. gattii + C. neo- formans</i>	LSU	M861_CryptoGattii_28S_4	GGGTTTCAGCCAGCTCTGCTGGTGTGA	25	60	64,6
		M862_CryptoGattii_28S_4_rc	TACACCAGCAGAGCTGGCTGAACCC	25	60	64,6
	ITS	M863_CrypG+N ITS_Lä	attGGGTTTCAGCCAGCTCTGCTGGTGTAttc	31	51,6	64,8
		M864_CrypG+N ITS_Lä_rc	gaaTACACCAGCAGAGCTGGCTGAACCCaat	31	51,6	64,8

Spezies	Ziel-gen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>C. gattii</i> + <i>C. neoformans</i>	ITS	M865_CrypG+N_ITS2_Lä*	agggTTGGGCTGCTTAAGCGGAAAGGCTtaggt	33	54,5	68,2
		M866_CrypG+N_ITS2_Lä_rc*	acctAAGCCTTTCCGCTTAAGCAGCCCAAacct	33	54,5	68,2
<i>C. neoformans</i>	EF-3	H024_Cry_neof_EF-3	CTCACTTCCCTTACTCGATGTACC	24	50	56,4
		H025_Cry_neof_EF-3_rc	GGTACATCGAGTAAGGGAAGTGAG	24	50	56,4
	LSU	L854_CryNeo_28S	GTTACAGCCAGTTCTGCTGGT	20	55	57,8
		L855_CryNeo_28S_rc	ACCAGCAGAAGCTGGCTGAAC	20	55	57,8
		M867_CryptoNeof_28S_1	ggGCTGGGGGAATGTAGCACTCTTCGggg	29	65,5	68,6
		M868_CryptoNeof_28S_1_rc	ccCGAAGAGTGTACATTCCTCCAGCcc	29	65,5	68,6
		M869_CryptoNeof_28S_2	ggATAAGGGCTGGGGGAATGTAGCACTct	29	55,2	64,5
		M870_CryptoNeof_28S_2_rc	agAGTGCTACATTCCTCCAGCCCTTATcc	29	55,2	64,5
		M871_CryptoNeof_28S_3	TGGATAAGGGCTGGGGGAATGTAGCACTCT	30	53,3	65,3
M872_CryptoNeof_28S_3_rc	AGAGTGCTACATTCCTCCAGCCCTTATCCA	30	53,3	65,3		
<i>D. capitatus</i>	ITS	H026_Dip_capi ITS	GCACCCCTTTTAGGGGTATGC	21	57,1	58,3
		H027_Dip_capi ITS_rc	GCATACCCCTAAAAGGGGTGC	21	57,1	58,3
		I775_Dip_cap ITS	CGCAGCGATTGCGAAATGTGATG	23	52,2	59,6
		I782_Dip_cap ITS_rc	CATCACATTCGCAATCGCTGCG	23	52,2	59,6
		L858_Dip_cap3 ITS	GGCACCCCTTTTAGGGGTATGCTTG	25	56	61,8
		L859_Dip_cap3 ITS_rc	CAAGCATAACCCCTAAAAGGGGTGCC	25	56	61,8
		L856_Dip_cap2 ITS	AACGCACATGGCACCCCTTTTAGGG	25	56	63,8
		L857_Dip_cap2 ITS_rc	CCCTAAAAGGGGTGCCATGTGCGTT	25	56	63,8
		M873_Dip_capSYN ITS	GAAAGCGCAGCGATTGCGAAATGTG	25	52	61,6
		M874_Dip_capSYN ITS_rc	CACATTTGCAATCGCTGCGCTTTC	25	52	61,6
		M875_Dip_capSYN2 ITS	GAACGCACATGGCACGTGGGGTGTGA	25	56	62,9
		M876_Dip_capSYN2 ITS_rc	TACACCCTACGTGCCATGTGCGTTC	25	56	62,9
		M877_GeoCapi ITS1	cttgAACGCACATGGCACCCCTTTTAGGGgtatg	34	52,9	66
		M878_GeoCapi ITS1_rc	catacCCCTAAAAGGGGTGCCATGTGCGTTcaag	34	52,9	66
		M881_GeoCapi ITS5	GATCTCTGGTCCCAGATCGATGAAGAGC	30	50	61,5
		M882_GeoCapi ITS5_rc	GCTCTTCATCGTGGGAACCAAGAGATC	30	50	61,5
		M879_GeoCapi ITS2*	cacatGGCACCCCTTTTAGGGGTATGCTTgtatgag	36	60	65,1
		M880_GeoCapi ITS2_rc*	ctcataCAAGCATAACCCCTAAAAGGGGTGCCatgtg	36	60	65,1
<i>E. floccosum</i>	ITS	H028_Epi_flocc ITSneu	CTTCTCTGAATGCTGGACGG	22	54,5	57,4
		H029_Epi_flocc ITSneu_rc	CCGTCCAGCATTACAGAGAGAAG	22	54,5	57,4
		L862_Epi_flocc2 ITS	ACAGCGCTCGCCGAAGGAGTGATTC	25	60	64,9
		L863_Epi_flocc2 ITS_rc	GAATCACTCTTCGGCGAGCGCTGT	25	60	64,9
		L860_Epi_flocc_Lä ITS*	ccccCTTCTCTGAATGCTGGACGGtgtc	30	60	66,2
		L861_Epi_flocc_Lä ITS_rc*	gacaCCGTCCAGCATTACAGAGAGAAGggggg	30	60	66,2
<i>F. solani</i>	Cal	H032_Fus_sola_Cal	CTGCTCTGAGTGGCGATCTTTTGG	24	54,2	60
		H033_Fus_sola_Cal_rc	CCAAAAGATCGCCACTCAGAGCAG	24	54,2	60
	LSU	H030_Fus_sola_28S	GAGGACCCCTAACTCTGTITTC	22	54,5	56,8
		H031_Fus_sola_28S_rc	GAACAGAGTTAGGGGGTCTCCTC	22	54,5	56,8
	SSU	L866_Fsol_18S	CCTCCGGGGCTCACTGGTGATT	22	63,6	63,5
		L867_Fsol_18S_rc	AATCACCAGTGAGCCCCGGAGG	22	63,6	63,5
		L868_Fsol2_18S	CAGCGAGTACTTCTTTGGCC	20	60	58,1
		L869_Fsol2_18S_rc	GGCCAAGGAAGTACTCGCTG	20	60	58,1
	ITS	I773_Fus_sol_1 ITS	CCAGAGGACCCCTAACTCTGTT	23	56,5	60
		I780_Fus_sol_1 ITS_rc	AACAGAGTTAGGGGGTCTCTGG	23	56,5	60
		I774_Fus_sol_2 ITS	CACACGCTTCCTCAAATACAG	23	56,5	60,1
		I781_Fus_sol_2 ITS_rc	CTGTATTTAGGGGACGGCGTGTG	23	56,5	60,1
		L864_Fus_sol_2_Lä ITS	gggCACACGCCGTCCTCCYCAAATACAGtgg	29	65,5	68,4
		L865_Fus_sol_2_Lä ITS_rc	ccaCTGTATTTGRGGGACGGCGTGTgcc	29	65,5	68,4
		M883_Fus_sol_2_NoLä ITS*	tgtgggCACACGCCGTCCTCCYCAAATACAGtggcgg	35	65,7	72,5
		M884_Fus_sol_2_NoLä ITS_rc*	ccgccactGTATTTGRGGGACGGCGTGTgccaca	35	65,7	72,5
<i>M. furfur</i>	ITS	H034_Mal_furf ITS	GAACTCCGCCCTCAGCTATAC	22	59,1	59,4
		H035_Mal_furf ITS_rc	GTATAGCTGACGGGCGGAGTTC	22	59,1	59,4
		L872_Mal_furf2 ITS	CAAACCCGTGTGCACCGTTTGGATGagt	28	53,6	64,7
		L873_Mal_furf2 ITS_rc	actCATCAAACGGTGCACACGGGTTTg	28	53,6	64,7
		L870_Mal_furf_Lä ITS	ggagGAACTCCGCCCTCAGCTATACcaac	30	60	66,1
		L871_Mal_furf_Lä ITS_rc	gttgGTATAGCTGACGGGCGGAGTTctcc	30	60	66,1
<i>M. furfur</i>	ITS	M891_Mal_furf_NoLä ITS*	gatggagGAACTCCGCCCTCAGCTATACcaact	35	54,3	66,9
		M892_Mal_furf_NoLä ITS_rc*	agtttgTATAGCTGACGGGCGGAGTTCctccatc	35	54,3	66,9

Spezies	Ziel-gen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>M. hiemalis</i>	ITS	I756_Muc_hiemG2_ITS	GCGTCTGAGGAATGCTTTTAGCC	24	50	57,9
		I757_Muc_hiemG2_ITS_rc	GGCTAAAAGACATTCTCAGACGC	24	50	57,9
		H040_Muc_hiem_ITS	CCGAGCTGAAGTCAGGTTTAGACC	23	54,2	59,1
		H041_Muc_hiem_ITS_rc	GGTCTAAACCTGACTTCAGCTCGG	23	54,2	59,1
		M893_Muc_hiemG2_NoLä_ITS	gttaaCCGAGCTGAAGTCAGGTTTAGACctgg	32	50	62,7
		M894_Muc_hiemG2_NoLä_ITS_rc	ccaGGTCTAAACCTGACTTCAGCTCGGttaac	32	50	62,7
		L874_Muc_hiemG2_Lä_ITS*	taaCCGAGCTGAAGTCAGGTTTAGACctgg	30	50	62,4
L875_Muc_hiemG2_Lä_ITS_rc*	ccaGGTCTAAACCTGACTTCAGCTCGGtta	30	50	62,4		
<i>M. plumbeus, M. racemosus</i>	ITS	I776_Mu_pl+ra_ITS	GATTATTGGGGGCTCTCGATCTG	24	54,2	59
		I783_Mu_pl+ra_ITS_rc	CAGATCGAGAGGCCCAATAATC	24	54,2	59
		L876_Mu_pl+ra_Lä_ITS	AGGATTATTGGGGGCTCTCGATCT	25	52	61,2
		L877_Mu_pl+ra_Lä_ITS_rc	AGATCGAGAGGCCCAATAATCCT	25	52	61,2
		L878_Mu_pl+ra2_ITS	GTAATTGACTTTGATGGGGCCTCCC	25	52	59,8
		L879_Mu_pl+ra2_ITS_rc	GGGAGGCCCATCAAAGTCAATTAC	25	52	59,8
		L880_Mu_pl+ra2_Lä_ITS*	cttGTAATTGACTTTGATGGGGCCTCCCaaa	31	45,2	62,1
L881_Mu_pl+ra2_Lä_ITS_rc*	tttGGGAGGCCCATCAAAGTCAATTACaag	31	45,2	62,1		
<i>M. racemosus</i>	LSU	H044_Muc_race_28S	GCGAATGCCTTTAGGCAAGATTGC	24	50	59,3
		H045_Muc_race_28S_rc	GCAATCTTGCCCTAAAGGCATTCCG	24	50	59,3
		L890_MracG_28S	CCITTAGGCCAAGATTGCTGG	20	50	53,9
		L891_MracG_28S_rc	CCAGCAATCTTGCCCTAAAGG	20	50	53,9
		L892_MracG2_28S	TTCGTTTTGGGTGCACTTGC	20	50	56,9
	L893_MracG2_28S_rc	GCAAGTGCACCCAAAACGAA	20	50	56,9	
	SSU	L886_Mrac_18S	GGTTGGCAACAACCTTTCTC	20	50	54,5
		L887_Mrac_18S_rc	GAGAAAGGTTGTGCCAAC	20	50	54,5
		L888_Mrac2_18S	CCCAAACCTTCAAGTGGGTG	20	50	53,8
L889_Mrac2_18S_rc		CACCCATTCTGAAGTTGGG	20	50	53,8	
<i>M. pusillus</i>	ITS	H042_Muc_pusi_ITS	GAGCCGCGATTCTCTCTTTTG	23	52,2	58,4
		H043_Muc_pusi_ITS_rc	CAAAAAGGAGAGAATCGCGCTC	23	52,2	58,4
		L882_Muc_pusi_Lä_ITS	ggtGAGCCGCGATTCTCTCTTTTgtga	29	51,7	63,8
		L883_Muc_pusi_Lä_ITS_rc	tcaCAAAAAGGAGAGAATCGCGGCTCacc	29	51,7	63,8
		L884_Mu_pusi2_ITS*	ATGTTCTGAGGGATTGCTCCAGATCTCTCG	30	50	62,4
		L885_Mu_pusi2_ITS_rc*	CGAGAGATCTGGAGCAATCCCTCAGAACAT	30	50	62,4
<i>P. brasiliensis</i>	ITS	H048_Par_bras_28S	CTTCGTACACGCTCTCAGAGG	22	59,1	59,4
		H049_Par_bras_28S_rc	CCTCTGAGAGCGTGTGACGAAG	22	59,1	59,4
		H046_Par_bras_ITS	GTTCGGAGCTTTGACGTCTGAGAC	24	54,2	59,5
		H047_Par_bras_ITS_rc	GTCTCAGACGTCAAAGCTCCGAAC	24	54,2	59,5
		L896_Par_bras_2_ITS	GCCGGGACACCCGTTGAACTCTGGTT	27	59,3	66,3
		L897_Par_bras_2_ITS_rc	AACCAGAAGTTCAACGGTGTCCCGGGC	27	59,3	66,3
		L898_Par_bras_3_ITS	CACACGCTCTCAGAGGCCCGG	21	71,4	64,7
		L899_Par_bras_3_ITS_rc	CCGGCCCTCTGAGAGCGTGTG	21	71,4	64,7
		L894_Par_bras_Lä_ITS	cttctgTTCGGAGCTTTGACGTCTGAGAC	30	53,3	63,2
		L895_Par_bras_Lä_ITS_rc	GTCTCAGACGTCAAAGCTCCGAACcagaag	30	53,3	63,2
		M897_Par_bras_NoLä_ITS	gaactctgTTCGGAGCTTTGACGTCTGAGACc	34	52,9	65,1
		M898_Par_bras_NoLä_ITS	gGTCTCAGACGTCAAAGCTCCGAACcagaagttc	34	52,9	65,1
		M899_PaCocBras_ITS1	cccGCCGGGGACACCGTTGAACTTCTGGTTcgg	33	66,7	71,4
		M900_PaCocBras_ITS1_rc	ccgAACCCAGAAGTTCAACGGTGTCCCGGGCggg	33	66,7	71,4
		M901_PaCocBras_ITS4	GGAGCTTTGACGTCTGAGACCTATC	25	52	58,6
		M902_PaCocBras_ITS4_rc	GATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTCC	25	52	58,6
		M903_PaCocBras_ITS5*	ggttCGGAGCTTTGACGTCTGAGACCTAtata	33	48,5	63
	M904_PaCocBras_ITS5_rc*	tatgATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTCCGaacc	33	48,5	63	
	SSU	L900_Pbras_18S	ACGGGGTTCATATGATGACC	20	50	54,4
		L901_Pbras_18S_rc	GGTCATCATATGAACCCCGT	20	50	54,4
		L902_PbrasLä_18S	CGGACGGGGTTCATATGATGACCCG	25	60	62,9
		L903_PbrasLä_18S_rc	CGGGTCATCATATGAACCCCGTCCG	25	60	62,9
		L904_Pbras_28S	CACTCCCCGTGGTCCGGCC	20	80	67,9
L905_Pbras_28S_rc		GCCCCACCCACGGGGGAGTG	20	80	67,9	
LSU	L906_Pbras2_28S	CCGGCCGGCCCCGCGCTGT	20	90	75,7	
	L907_Pbras2_28S_rc	ACACGGGGGGGGCCGGCCGG	20	90	75,7	
	H050_Pen_marn_ITS	GGTCACCACATATTACCACGG	23	52,2	57,7	
<i>P. marneffei</i>	ITS	H051_Pen_marn_ITS_rc	CCGTGGTAAATATGGTGGTGACC	23	52,2	57,7

Spezies	Ziel-gen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>P. marneffei</i>	ITS	L908_Pen_marn_Lä ITS*	gggggttGGTCACCACCATATTTACCACGGt	30	53,3	64,9
		L909_Pen_marn_Lä ITS_rc*	aCCGTGGTAAATATGGTGGTGACCaaacccc	30	53,3	64,9
<i>P. jiroveci</i>	ITS	M905_Pn_jiro ITS	CAAGCAGAAAAAAGGGGATTGGGC	24	50	59,2
		M906_Pn_jiro ITS_rc	GCCCAATCCCCTTTTTCTGCTTG	24	50	59,2
		M907_Pn_jiro_Lä ITS	CAAGCAGAAAAAAGGGGATTGGGCTTTgc	29	48,3	62,5
		M908_Pn_jiro_Lä ITS_rc	gcAAAGCCCAATCCCCTTTTTCTGCTTG	29	48,3	62,5
		M909_Pn_jiro2 ITS*	CTGGCTTTTTGCTTGCCCTGCCAAAGGTG	30	53,3	65,5
		M910_Pn_jiro2 ITS_rc*	CACCTTTGGCGAGGCAAGCAAAAAAGCCAG	30	53,3	65,5
<i>P. boydii</i>	SSU	L910_PsBoy_18S	TTCCGGGCTTCGTGGTGATT	20	55	59,4
		L911_PsBoy_18S_rc	AATCACCCAGAAAGCCCCGAA	20	55	59,4
		L912_PsBoy2_18S	TGGCCGTGGCGGGGAAACAG	20	70	65,7
	ITS	L913_PsBoy2_18S_rc	CTGTTTCCCCGCCACGGCCA	20	70	65,7
		M911_PsallBoy ITS1	gcgaCCCCGTAGGCCCTGAAATACA	25	60	64,4
		M912_PsallBoy ITS1_rc	TGTATTTACAGGGCCTACGGGGtgcg	25	60	64,4
		M915_PsallBoy ITS7	gtcttcgcgaCCCCcGTAGGCCCTGAAATac	31	61,3	67,5
		M916_PsallBoy ITS7_rc	gtATTTACAGGGCCTACgGGGtgcggaagac	31	61,3	67,5
		M913_PsallBoy ITS4*	cttcgcgaCCCCGTAGGCCCTGAAAT	26	61,5	66,2
<i>R. microsporus</i>	ITS	M914_PsallBoy ITS4_rc*	ATTTACAGGGCCTACGGGGtgcggaag	26	61,5	66,2
		H060 Rhi_Genus ITSneu	GGCTATAATGGGTAGGCCTGTTC	23	52,2	57,2
		H061 Rhi_Genus ITSneu_rc	GAACAGGCCTACCCATTATAGCC	23	52,2	57,2
		I750 Rh_microG1 ITS	AAGGAAGGTGCCTGGTACCCTTTA	24	50	60
		I751 Rh_microG1 ITS_rc	TAAAGGGTACCAGGCACCTTCCTT	24	50	60
		I752 Rh_microG2 ITS	GAAAGGCCTGGTACCCTTTACC	23	60,9	61,9
		I753 Rh_microG2 ITS_rc	GGTAAAGGGTACCAGGCCCTTC	23	60,9	61,9
		M917_Rhi_microG_Lä ITS	catataGGCTATAATGGGTAGGCCTGTtctggggtt	36	47,2	63,9
		M918_Rhi_microG_Lä ITS_rc	aaccccagAACAGGCCTACCCATTATAGCctatatg	36	47,2	63,9
<i>R. oryzae</i>	SSU	L914_Rhi_microG ITS*	ataGGCTATAATGGGTAGGCCTGTtctggg	30	50	62,3
		L915_Rhi_microG ITS_rc*	cccagAACAGGCCTACCCATTATAGCctat	30	50	62,3
		H052 Rhi_oryz_18S	CCATTGACTCCTAGTCTCTGTGG	23	56,5	58,7
		H053 Rhi_oryz_18S_rc	CCACGAGGACTAGGAGTCAATGG	23	56,5	58,7
	ITS	H054 Rhi_oryz_28S	CTGTGATTCACTACCCTGTG	20	50	52,7
		H055 Rhi_oryz_28S_rc	CACAGGGTAGTGAATCACAG	20	50	52,7
		L918_RhiOryG_Lä ITS	gCGCCTTACCTTAGGGTTCTCTTgggg	28	60,7	65,6
		L919_RhiOryG_Lä ITS_rc	ccccAGAGGAAACCCTAAGGTAAGGCGc	28	60,7	65,6
		M919_RhiOryG_SYN ITS	CGCCTTACCTTAGGGTTCTCTCT	25	52	59,8
ITS	M920_RhiOryG_SYN ITS_rc	AGAGGAAACCCTAAGAGGTAAGGCG	25	52	59,8	
	L916_RhiOryG ITS*	CGCCTTACCTTAGGGTTCTCTCT	23	52,2	58,3	
	L917_RhiOryG ITS_rc*	AGAGGAAACCCTAAGGTAAGGCG	23	52,2	58,3	
<i>R. stolonifer</i>	LSU	H058 Rhi_stolo_28S	CCTTTGGTAAACAAGGCAGTGAG	22	50	56
		H059 Rhi_stolo_28S_rc	CTCACTGCCTTGTTACCAAAGG	22	50	56
	ITS	H056 Rhi_stolo ITSneu	GGCGGTTATATAACGGTGACCCGG	23	56,5	59,6
		H057 Rhi_stolo ITSneu_rc	CCGGTACCCGTTATATAACCCGCC	23	56,5	59,6
		L920_Rhi_stolo_Lä ITS*	catGGCGGTTATATAACGGTGACCCGtatg	30	50	61,8
L921_Rhi_stolo_Lä ITS_rc*	cataCCGGTACCCGTTATATAACCCGCCatg	30	50	61,8		
<i>R. minuta</i>	ITS	I777 Rho_min ITS	GTAATGAAATGGGCGTGGGCTTGG	24	54,2	60,9
		I784 Rho_min ITS_rc	CCAAGCCCACGCCATTTTCATTAC	24	54,2	60,9
		L922_Rho_min2 ITS	GTAATGAGATAAGTGCGGGCTTGG	24	50	57,8
		L923_Rho_min2 ITS_rc	CCAAGCCCGCACTTATCTCATTAC	24	50	57,8
		M923_RhodoMin ITS2	TAAGAGGTGCTTCTAATGCCG	21	47,6	55,1
		M924_RhodoMin ITS2_rc	GCGCATTAGAAGCACCTCTTA	21	47,6	55,1
		M925_RhodoMin ITS3	CTGTGGCGTAATTGCCGGCT	21	61,9	62,7
		M926_RhodoMin ITS3_rc	AGCCGGCAATTACGCCGACAG	21	61,9	62,7
		M921_RhodoMin ITS1*	CTTACTACTGTGCACACACTTC	21	47,6	53,9
M922_RhodoMin ITS1_rc*	GAAGTGTGTGCACAGTGAAG	21	47,6	53,9		
<i>S. cerevisiae</i>	Cal	H062 Sac_cere_Cal	GAGAGGTTAGTGATGGATCAGGCG	24	54,2	58,8
		H063 Sac_cere_Cal_rc	CGCCTGATCCATCACTAACCTCTC	24	54,2	58,8
	EF-3	H064 Sac_cere_EF-3	CAGACGAGGGAATTTTCACACCAG	24	50	57,9
		H065 Sac_cere_EF-3_rc	CTGGTGTGAAAATTCCTCTGCTG	24	50	57,9
	SSU	L926_Scer_18S	ACTTTGGGCCCGGTTGGCCG	20	70	66,1
		L927_Scer_18S_rc	CGGCCAACCCGGGCCCAAAGT	20	70	66,1
LSU	L928_Scer_28S	GTAGCTTGCCTCGGTAAGTA	20	50	53,9	
	L929_Scer_28S_rc	TACTTACCAGGCAAGCTAC	20	50	53,9	

Spezies	Ziel-gen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>S. cerevisiae</i>	LSU	L930_Scer2_28S	GGAGTGC GGTTCTTTGTAAAGTGCC	25	52	60,4
		L931_Scer2_28S_rc	GGCACTTTACAAAGAACC GCACTCC	25	52	60,4
	ITS	I744_S_cere ITS	CTTTGGGCATTCGAGCAATCGG	22	54,5	59,1
		I745_S_cere ITS_rc	CCGATTGCTCGAATGCCCAAAG	22	54,5	59,1
		M927_SaccCer ITS1	ttttCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGggcc	30	53,3	66,1
		M928_SaccCer ITS1_rc	ggccCCGATTGCTCGAATGCCCAAAGaaaa	30	53,3	66,1
		M929_SaccCer ITS3	ttttccaAAGAGAGGTTTCTCTGCGtg	27	44,4	59,2
		M930_SaccCer ITS3_rc	caCGCAGAGAAACCTCTCTTtgaaaa	27	44,4	59,2
		M931_SaccCer ITS9	tatcGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCgaac	30	46,7	60,3
		M932_SaccCer ITS9_rc	gttcGCCTAGACGCTCTCTTATCgata	30	46,7	60,3
L924_S_cere_Lä ITS*	ctttttCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGggc	31	51,6	64,8		
L925_S_cere_Lä ITS_rc*	gccCCGATTGCTCGAATGCCCAAAGaaaaaag	31	51,6	64,8		
<i>S. schenckii</i>	ITS	H066_Spo_sche ITS	GAACCGTACCCAATCTCGTTCTC	23	52,2	57,2
		H067_Spo_sche ITS_rc	GAGAACGAGATTGGGTACGGTTC	23	52,2	57,2
		L932_Spo_scheG ITS	GCGCAGTACCGAACGCATGTTCTCC	25	60	63,9
		L933_Spo_scheG ITS_rc	GGAGAACATGCGTTCCGTTACTGCGC	25	60	63,9
		L934_Spo_scheG2 ITS	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGC	25	52	60,1
		L935_Spo_scheG2 ITS_rc	GCCAGAAGCAACGAGAACGAGATTG	25	52	60,1
		M933_SpSchenckii ITS1*	ccCAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCgg	29	58,6	65,8
		M934_SpSchenckii ITS1_rc*	ccGCCAGAAGCAACGAGAACGAGATTGgg	29	58,6	65,8
		M935_SpSchenckii ITS3	ccgaGCGCAGTACCGAACGCATGTTCTCC	29	62,1	67,2
		M936_SpSchenckii ITS3_rc	GGAGAACATGCGTTCCGTTACTGCGCctgg	29	62,1	67,2
M937_SpSchenckii ITS9	gaaAACGCCATGACGCGCAGCTCTTTTtac	31	51,6	65		
M938_SpSchenckii ITS9_rc	gtaAAAAGAGCTGCGCGTCATGCGCGTttc	31	51,6	65		
<i>T. mentagrophytes</i>	ITS	I746_Tr_mentaG1 ITS	CCTTAGC CCCCATTCTTGCTACC	24	54,2	59,3
		I747_Tr_mentaG1 ITS_rc	GGTAGACAAGAATGGGGCGTAAGG	24	54,2	59,3
		I748_Tr_mentaG2 ITS	CCTAGGCGAATGGGCAACAAAC	22	54,5	58,9
		I749_Tr_mentaG2 ITS_rc	GTTTGTGCCCATTCGCTTAGG	22	54,5	58,9
		L936_Tr_mentaG2_Lä ITS	cttCCTAGGCGAATGGGCAACAAACcag	28	53,6	63,1
		L937_Tr_mentaG2_Lä ITS_rc	ctgGTTTGTGCCCATTCGCTTAGGaa	28	53,6	63,1
		M941_TrichophMenta ITS4	cttgTCTACMTTACTCGGTTGCCTCGcgg	30	56,7	65,6
		M942_TrichophMenta ITS4_rc	ccgcCGAGGCAACCCGAGTAAKGTAGAcaag	30	56,7	65,6
		M939_TrichophMenta ITS2*	TCTACMTTACTCGGTTGCCTCG	22	50	57,3
M940_TrichophMenta ITS2_rc*	CGAGGCAACCCGAGTAAKGTAGA	22	50	57,3		
<i>Trichophyton</i> spp.	SSU	L948_TrphMRT_18S	CGGAACCAGGGCTTTTACTG	20	55	56,1
		L949_TrphMRT_18S_rc	CAGTAAAAGCCCTGGTTCCG	20	55	56,1
<i>T. rubrum</i>	ITS	I778_Tphy_rubG2 ITS	AATGGGCAGCCAATCCAGC	19	57,9	58,9
		I785_Tphy_rubG2 ITS	GCTGGATTGGCTGCCCAT	19	57,9	58,9
		H070Tphy_rub_Genus ITSneu	CGAATGGGCAGCCAATTCAG	20	55	57
		H071Tphy_rub_Genus ITSneu_rc	CTGAATTGGCTGCCCATTCG	20	55	57
		L938_Tphy_rubG2_Lä ITS	ggcgAATGGGCAGCCAATYCAGCgc	25	68	67,9
		L939_Tphy_rubG2_Lä ITS_rc	gcGCTGRATTGGCTGCCCATTCg	25	68	67,9
		M943_TphytonRub ITS	ggcgAATGGGCAGCCAATYCAGCgcctcag	31	67,7	71,1
		M944_TphytonRub ITS_rc	ctgagggcGCTGRATTGGCTGCCCATTCg	31	67,7	71,1
		L940_Tphy_rubG3 ITS*	AGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGC	25	52	60,5
		L941_Tphy_rubG3 ITS_rc*	GCTAAACGCTCAGACTGACAGCTCT	25	52	60,5
L942_Tphy_rubG4 ITS	CCGCCGGAGGACAGACACCAAGAAA	25	60	64,7		
L943_Tphy_rubG4 ITS_rc	TTTCTGGTGTCTGTCTCCGGCGG	25	60	64,7		
<i>T. tonsurans</i>	ITS	H072_Tphy_tons_Genus ITSneu	GCCTCTCTTTATAGCGGCTCAACG	24	54,2	59,5
		H073Tphy_tons_Genus ITSneu_rc	CGTTGAGCCGCTATAAAGAGAGGC	24	54,2	59,5
		L944_Tphy_tons_G_Lä ITS	CGAGCCTCTTTATAGCGGCTCAACGCTG	30	56,7	64,9
		L945_Tphy_tons_G_Lä ITS_rc	CAGCGTTGAGCCGCTATAAAGAGAGGCTCG	30	56,7	64,9
		L946_Tphy_tonsG ITS*	ATTCGGGCTTCTAGGCGAATGGGC	25	56	63,3
		L947_Tphy_tonsG ITS_rc*	GCCCATTGCGCTAGAAAAGCCGGAAT	25	56	63,3
<i>T. asahii</i>	ITS	H074_Tspo_asah_Genus ITS	CGTCTGCGATTTCTGATCGCTC	22	54,5	58,1
		H075_Tspo_asah_Genus ITS_rc	GAGCGATCAGAAATCGCAGACG	22	54,5	58,1
		L952_Trspo_asahii_Lä ITS	TGGATTGGATTTGGGCGTCTGCGATTCTG	30	50	64
		L953_Trspo_asahii_Lä ITS_rc	CAGAAATCGCAGACGCCAAATCCAATCCA	30	50	64
		M945Trspo_asahii_NoLä ITS	taaTGGATTGGATTTGGGCGTCTGCGATTCTGatc	36	44,4	63,9
		M946Trspo_asahii_NoLä ITS_rc	gatCAGAAATCGCAGACGCCAAATCCAATCCA	36	44,4	63,9

Spezies	Ziel-gen	Sonde	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>T. asahii</i>	ITS	L950__Trspo_asahii ITS	GGGCGTCTGCGATTTCTGATCGCTCGCC	28	64,3	67,9
		L951__Trspo_asahii ITS_rc	GGCGAGCGATCAGAAATCGCAGACGCC	28	64,3	67,9
<i>T. asahii</i> + <i>T. asteroides</i>	SSU	L966__TrspA+A_18S	GAGTGTGCAGTGGAAACCAGG	20	60	58,3
		L969__TrspA+A2_18S_rc	CCTGGTCCACTGCACACTC	20	60	58,3
		L968__TrspA+A2_18S	TTTTGACTGGATCGGCACCT	20	50	56,8
		L969__TrspA+A2_18S_rc	AGGTGCCGATCCAGTCAAAA	20	50	56,8
<i>T. asteroides</i>	ITS	H076 Tspo_aste_Genus ITS	GATTTGGGCGTCTGCGATCTC	21	57,1	58,5
		H077 Tspo_aste_Genus ITS_rc	GAGATCGCAGACGCCCAAATC	21	57,1	58,5
		M947 Tspo_aste_GNoLä ITS	ggattgGATTTGGGCGTCTGCGATYTCtgatcg	33	54,5	65,3
		M948 Tspo_aste_GNoLä ITS_rc	cgatcaGARATCGCAGACGCCCAAATCcaatcc	33	54,5	65,3
		L954__Tspo_aste_GLä ITS*	ttgGATTTGGGCGTCTGCGATYTCtga	27	51,9	63,0
		L955__Tspo_aste_GLä ITS_rc*	tcaGARATCGCAGACGCCCAAATCcaa	27	51,9	63,0
<i>T. cutaneum</i>	ITS	H078 Tspo_cuta_Genus ITS	CGCTGGTGTGACTTGAGAAG	21	52,4	56,1
		H079 Tspo_cuta_Genus ITS_rc	CTTCTCAAGTCAACACCAGCG	21	52,4	56,1
		L956__Trsp_cutaG_LÄ ITS	TTTCGCTGGTGTGACTTGAGAAGTGC	27	48,1	61,3
		L957__Trsp_cutaG_LÄ ITS_rc	GCACTTCTCAAGTCAACACCAGCGAAA	27	48,1	61,3
<i>T. cutaneum</i> + <i>T. mucoides</i>	SSU	L962__TrspC+M_18S	ATTGGCGTTAAGAAGCCGCG	20	55	58,7
		L963__TrspC+M_18S_rc	GCCGGCTTCTTAACGCCAAT	20	55	58,7
		L964__TrspC+M2_18S	GGCGTTTAGCCAAAGGAAGT	20	50	55,8
		L965__TrspC+M2_18S_rc	ACTTCCTTTGGCTAAACGCC	20	50	55,8
<i>T. mucoides</i>	ITS	L958__Trspo_mucG ITS	CTTGGATTTGGGCGTGCCACTTGC	25	60	65,1
		L959__Trspo_mucG ITS_rc	GCAAGTGGCAGCGCCCAAATCCAAG	25	60	65,1
		L960__Trspo_mucG2 ITS*	CGCTGGTGTAGACTTGAGAAGTGC	25	56	61,3
		L961__Trspo_mucG2 ITS_rc*	CGCACTTCTCAAGTCTACACCAGCG	25	56	61,3

Sonden des finalen Mikroarrays

Tabelle 50: Sonden des finalen Mikroarrays. Gelistet sind die zu identifizierenden Spezies, die Lage der Sonde innerhalb der ITS-Spacer ITS1 oder ITS2, der Sondenname sowie die –Sequenz, die Länge der Sonden durch Anzahl der Basenpaare (bp), der Gehalt an Guanin- und Cytosinbasen in Prozent (GC) und die Schmelztemperatur der Sonden in °C (Tmp). Die Sonden des finalen Mikroarrays sind mit * gekennzeichnet. Die Schmelztemperaturen von Sonden mit degenerierten Basen (M, R, Y und K) entsprechen dem Mittelwert der berechneten Temperaturen der Sonden mit den jeweiligen Basen.

Spezies	ITS	Sonde	Sondensequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>Absidia caerulea</i>	ITS1	G953_Abs_caer_ITS	CGGACCCTGGATATTTTAGCCCC	24	54,2	59,5
		G954_Abs_caer_ITS_rc	GGGGCTAAAAATATCCAGGGTCCG	24	54,2	59,5
<i>A. cylindrospora</i>	ITS2	L718_Abs_cyli_Lä_ITS	gctCTGGCATCCCTCTTTAGAGTTGctt	29	51,7	62,2
		L719_Abs_cyli_Lä_ITS_rc	gaaGCAACTCTAAAGAGGGATGCCAGagc	29	51,7	62,2
<i>Absidia glauca</i>	ITS1	L726_Abs_glau_Lä_ITS	ccGCTGGAACTTTTGACATCTCCGc	27	55,6	63,6
		L727_Abs_glau_Lä_ITS_rc	gGCGGAGATGTCAAAAGTTTCCAGCgg	27	55,6	63,6
<i>Absidia spinosa</i>	ITS2	L728_Aspin_ITS	ACGCATCTGCACCCYTGGTATTc	25	52	61,5
		L729_Aspin_ITS_rc	GAATACCCARGGGTGCAAGATGCGT	25	52	61,5
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	ITS2	M885_LichCory_ITS1	GCATCTGCGCCTAGTAGTcaactactagg	31	48,4	60,9
		M886_LichCory_ITS_rc	cctagtagattGACTACTAGGCGCAAGATGC	31	48,4	60,9
<i>Ajellomyces capsulatus, dermatitidis</i>	ITS1	L740_Aderm2_ITS	ACACCGCTAGAACCTCTGGTGAACGATTGA	30	46,7	62,5
		L741_Aderm2_ITS_rc	TCAATCGTTACCAGAAGTCTAGCGGTGT	30	46,7	62,5
<i>Arthroderma gypseum</i>	ITS1	M795_Agyp_NoLä_ITS	GAGGAGTGATTAATCCATgaaTactGTTccg	33	39,4	58,7
		M796_Agyp_NoLä_ITS_rc	cggAACAgTAttcATGGATTTAATCACTCCTC	33	39,4	58,7
<i>Arthroderma otae</i>	ITS1	M799_ArOta_ITS2	CGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGT	26	53,8	63,2
		M800_ArOta_ITS2_rc	ACTGATTTGCGTTGCTCGCTCAGACG	26	53,8	63,2
<i>Aspergillus flavus</i>	ITS2	L772_AflavG_Lä_ITS	gcgcttgccGAACGCAAATCAATCTTTT	29	46,4	62,6
		L773_AflavG_Lä_ITS_rc	AAAAGATTGATTTGCTTGGcaagcgc	29	46,4	62,6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ITS2	L776_Asp_fumi_Lä_ITS	tgggcTTTGTCTAGGCTGTAGGCCc	29	62,1	68,4
		L777_Asp_fumi_Lä_ITS_rc	gGGCTACAGAGCAGGTGACAAAGcccca	29	62,1	68,4
<i>Aspergillus niger</i>	ITS2	L780_AnigG_Lä_ITS	ggcgCCTGCCGACGTTTTCAACCATT	27	59,3	67,3
		L781_AnigG_Lä_ITS_rc	AATGGTTGAAAACGTCGGCAGGcgc	27	59,3	67,3
<i>Aspergillus terreus</i>	ITS1	M828_ATerG_NoLä_ITS	AAGCTTGACAGTCTGAGTGTGATTCTTTGCA	30	43,3	62
		M827_ATerG_NoLä_ITS_rc	TGCAAAGAATCACACTCAGACTGCAAGCTT	30	43,3	62
<i>Candida albicans</i>	ITS2	G985_Can_albi_ITS	GAAAGACGGTAGTGGTAAGGCC	22	54,5	57,5
		G986_Can_albi_ITS_rc	CGCCTTACCCTACCCTCTTTT	22	54,5	57,5
<i>Candida dubliniensis</i>	ITS2	L788_Can_dubl_Lä_ITS	gatGATAGTGGTATAAGGCGGAGatgc	27	48,1	58,5
		L789_Can_dubl_Lä_ITS_rc	gcatCTCCGCTTATACCCTATcatc	27	48,1	58,5
<i>Candida famata</i>	ITS1	L792_Cfam_Lä_ITS	tttGGTCTGGACTAGAAATAGTTTGgccc	29	44,8	60,1
		L793_Cfam_Lä_ITS_rc	ggcCAAACCTATTCTAGTCCAGACCaaa	29	44,8	60,1
<i>Candida glabrata</i>	ITS2	I738_C_glab_ITS	GTAGGCATATCAGTATGTGGGAC	24	50	56,7
		I739_C_glab_ITS_rc	GTCCACATACTGATATGGCCTAC	24	50	56,7
<i>C. guilliermondii</i>	ITS1	I734_C_guilG_ITS	GGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGG	24	54,2	59
		I735_C_guilG_ITS_rc	CCCAACCTATCTAGGCCAAACC	24	54,2	59
<i>Candida kefyr</i>	ITS1	G997_Can_kefy_ITS	CTGGGGGAATCGTCTGAACAAGG	23	56,5	59,6
		G998_Can_kefy_ITS_rc	CCTTGTTCAGACGATCCCCCAG	23	56,5	59,6
<i>Candida krusei</i>	ITS1	I740_C_krusei_ITS	GAGCGGAACGAAAACAACAACACC	24	50	59,1
		I741_C_krusei_ITS_rc	GGTGTTGTGTTTTCTGTTCCGCTC	24	50	59,1
<i>Candida lusitanae</i>	ITS2	L798_Can_lusiG_Lä_ITS	caaccGCGCTGTCAAACACGTTTACAGCagc	33	54,5	66,7
		L799_Can_lusiG_Lä_ITS_rc	gtcgtGCTGTAACGTGTTGACAGCGCggttg	33	54,5	66,7
<i>C. metapsilosis, C. orthopsilosis</i>	ITS1	M833_CandOrtho_ITS1	tttgggtggcccatggcctgcccagaga	27	63	69,6
		M834_CandOrtho_ITS1_rc	tctctggcagggccatgggcccacaaa	27	63	69,6
<i>Candida parapsilosis</i>	ITS1	M841_Cpara_ITS1	GGCCTTCTATATGGGGCCTGCCAGAGATTA	30	53,3	64,1
		M842_Cpara_ITS1_rc	TAATCTCTGGCAGGCCCATATAGAAGGCC	30	53,3	64,1
<i>Candida pulcherrima</i>	ITS2	L822_C_pulG2_ITS	GCTTCGGCCTAATATCAACGGCGCTAGAAT	30	50	63,3
		L823_C_pulG2_ITS_rc	ATTCTAGCGCGTTGATATTAGGCCGAAGC	30	50	63,3
<i>Candida tropicalis</i>	ITS1	L830_Can_trop_Lä_ITS	gaaCAAATTTCTTTGGTGGCGGGAGCaatcc	31	48,4	63,3
		L831_Can_trop_Lä_ITS_rc	ggattGCTCCCGCCACCAAAGAAATTTGttc	31	48,4	63,3
<i>Coccidioides immitis, C. posadasii</i>	ITS2	L840_CocGenus2_ITS	CATTGCAAACCCTCAAGCACGGCT	25	52	62,6
		L841_CocGenus2_ITS_rc	AGCCGTGCTTGAAGGGTTTGAATG	25	52	62,6

Spezies	ITS	Sonde	Sondensequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
<i>Epidermophyton floccosum</i>	ITS1	L860__Epi_flocc_Lä ITS	ccccCTTCTCTGAAATGCTGGACGGtgtc	30	60	66,2
		L861__Epi_flocc_Lä ITS_rc	gacaCCGTCCAGCATTCAGAGAGAAAGgggg	30	60	66,2
<i>Fusarium solani</i>	ITS2	M883_Fus_sol_2_NoLä ITS	tgtgggCACACGCCCTCCYCAAATACAGtggcgg	35	65,7	72,5
		M884_Fus_sol_2_NoLä ITS_rc	ccgccaCTGTATTTGRGGGACGGC GTGTGcccaca	35	65,7	72,5
<i>Cryptococcus gattii</i> , <i>C. neoformans</i>	ITS2	M865_CrypG+N ITS2_Lä	agggITGGGGCTGCTTAAGCGGAAAGGCTTtaggt	33	54,5	68,2
		M866_CrypG+N ITS2_Lä_rc	acctAAGCCTTCCGCTTAAGCAGCCCAAcct	33	54,5	68,2
<i>Dipodascus capitatus</i>	ITS2	M879_GeoCapi ITS2	cacatGGCACCCCTTTAGGGGTATGCTTGtatgag	36	60	65,1
		M880_GeoCapi ITS2_rc	ctcataCAAGCATAACCCTAAAAGGGGTGCcatgtg	36	60	65,1
<i>Malassezia furfur</i>	ITS2	M891_Mal_furf_NoLä ITS	gatggagGAACTCCGCCCTCAGCTATACcaaact	35	54,3	66,9
		M892_Mal_furf_NoLä ITS_rc	agtttgGTATAGCTGACGGCGGAGTTCctccatc	35	54,3	66,9
<i>Mucor hiemalis</i>	ITS1	L874__Muc_hiemG2_Lä ITS	taaCCGAGCTGAAGTCAGGTTTAGACCtgg	30	50	62,4
		L875__Muc_hiemG2_Lä ITS_rc	ccaGGTCTAAACCTGACTTCAGCTCGGtta	30	50	62,4
<i>Mucor plumbeus</i> , <i>M. racemosus</i>	ITS2	L880__Mu_pl+ra2_Lä ITS	cttGTAATTGACTTTGATGGGGCCTCCcaa	31	45,2	62,1
		L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc	tttGGGAGGCCCATCAAAGTCAATTACaag	31	45,2	62,1
<i>Mucor pusillus</i>	ITS1	L884__Mu_pusi2 ITS	ATGTTCTGAGGGATTGCTCCAGATCTCTCG	30	50	62,4
		L885__Mu_pusi2 ITS_rc	CGAGAGATCTGGAGCAATCCCTCAGAACAT	30	50	62,4
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	ITS1	M903_PaCocBras ITS5	ggttCGGAGCTTTGACGCTGAGACCTATcata	33	48,5	63
		M904_PaCocBras ITS5_rc	tatgATAGGTCTCAGACGTCAAAGCTCCGaacc	33	48,5	63
<i>Penicillium marneffei</i>	ITS2	L908__Pen_marn_Lä ITS	ggggttGGTCACCACCATATTTACCACGGt	30	53,3	64,9
		L909__Pen_marn_Lä ITS_rc	aCCGTGGTAAATATGGTGGTGACCcaacccc	30	53,3	64,9
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	ITS1	M909_Pn_jiro2 ITS	CTGGCTTTTTGCTTGCCCTCGCAAAGGTG	30	53,3	65,5
		M910_Pn_jiro2 ITS_rc	CACCTTTGGCGAGGCAAGCAAAAAGCCAG	30	53,3	65,5
<i>Pseudallescheria boydii</i>	ITS2	M913_PsallBoy ITS4	cttcgcaCCCCGTAGGCCCTGAAAT	26	61,5	66,2
		M914_PsallBoy ITS4_rc	ATTTAGGGCCTACGGGtgcggaag	26	61,5	66,2
<i>Rhizopus microsporus</i>	ITS1	L914__Rhi_microG ITS	ataGGCTATAATGGGTAGGCCCTGTTctggg	30	50	62,3
		L915__Rhi_microG ITS_rc	cccagAACAGGCC TACCATTATAGCCtat	30	50	62,3
<i>Rhizopus oryzae</i>	ITS1	L916__RhiOryG ITS	CGCCTTACCTTAGGGTTTCTCT	23	52,2	58,3
		L917__RhiOryG ITS_rc	AGAGGAAACCCTAAGGTAAGGCG	23	52,2	58,3
<i>Rhizopus stolonifer</i>	ITS1	L920__Rhi_stolo_Lä ITS	catGGCGGTTATATAACGGTGACCCGtatg	30	50	61,8
		L921__Rhi_stolo_Lä ITS_rc	cataCCGGTACC GTTATATAACC GCcatg	30	50	61,8
<i>Rhodotorula minuta</i>	ITS1	M921_RhodoMin ITS1	CTTACTGTGCACACACTTC	21	47,6	53,9
		M922_RhodoMin ITS1_rc	GAAGTGTGTGCACAGTGAAG	21	47,6	53,9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ITS1	L924__S_cere_Lä ITS	cttttCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGggc	31	51,6	64,8
		L925__S_cere_Lä ITS_rc	gccCCGATTGCTCGAATGCCCAAAGaaaag	31	51,6	64,8
<i>Sporothrix schenckii</i>	ITS1	M933_SpSchenckii ITS1	ccCAATCTGTTCTCGTTGCTTCTGGCgg	29	58,6	65,8
		M934_SpSchenckii ITS1_rc	ccGCCAGAAGCAACGAGAACGAGATTGgg	29	58,6	65,8
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ITS1	M939_TrichophMenta ITS2	TCTACMTTACTCGGTTGCCTCG	22	54,5	57,3
		M940_TrichophMenta ITS2_rc	CGAGGCAACC GAGTAAGTAGA	22	54,5	57,3
<i>Trichophyton rubrum</i>	ITS1	L940__Tphy_rubG3 ITS	AGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGC	25	52	60,5
		L941__Tphy_rubG3 ITS_rc	GCTAAACGCTCAGACTGACAGCTCT	25	52	60,5
<i>Trichophyton tonsurans</i>	ITS2	L946__Tphy_tonsG ITS	ATTCGGCTTTCTAGCGCAATGGGC	25	56	63,3
		L947__Tphy_tonsG ITS_rc	GCCCATTCGCCTAGAAAGCCGGAAT	25	56	63,3
<i>Trichosporon asteroides</i> , <i>T. asahii</i>	ITS2	L954__Tspo_aste_GLä ITS	ttgGATTTGGGCGTCTGCGATYTCtga	27	51,9	63,1
		L955__Tspo_aste_GLä ITS_rc	tcaGARATCGCAGACGCCCAAATCcaa	27	51,9	63,1
<i>Trichosporon mucoides</i> , <i>T. cutaneum</i>	ITS2	L960__Trspo_mucG2 ITS	CGCTGGTGTAGACTTGAGAAGTGCG	25	56	61,3
		L961__Trspo_mucG2 ITS_rc	CGCACTTCTCAAGTCTACACCAGCG	25	56	61,3

Primer für alle sechs Zielgene

Unterschieden werden eigens designte Primer (vgl. Tabelle 51) und veröffentlichte Primer (vgl. Tabelle 52). Das Primerdesign fand mittels *ARB* statt. Die Mindestlänge von 18 bp wurde nicht unterschritten, sodass das Annealing der Primer sichergestellt ist. Es wurden sowohl speziesspezifische als auch panfungale Primer designt. Die maximale Länge sowie der GC-Gehalt und die Schmelztemperatur wurden anwendungsspezifisch angepasst, um die Panfungalität bzw. die Spezifität der Primer zu gewährleisten. Alle Primersequenzen wurden mittels BLAST überprüft. Die Angaben zu GC-Gehalt und Schmelztemperatur wurden mittels Oligo Analyzer von IDT ermittelt.

Tabelle 51: Selbst entwickelte Primer. Gelistet nach Zielgenen und Spezies. Länge der Primer durch Anzahl der Basenpaare (bp), Gehalt an Guanin- und Cytosinbasen in Prozent (GC) und die Schmelztemperatur in °C (Tmp). Die Schmelztemperaturen von Primern mit degenerierten Basen (M, R, Y und K) entsprechen dem Mittelwert der berechneten Temperaturen der Primer mit den jeweiligen Basen.

Zielgen	Spezies	Primer	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
ITS	Panfungal	ITS2angepasst	GCTRCGTTCTTCATCGAT	18	47,2	51,1
		ITS3angepasst	ATCGATGAAGAACGYAGC	18	47,2	51,1
	<i>R. oryzae</i> , <i>R. stolonifer</i>	Rh_ory_stol_ITS_for	CTCGCATCGATGAAGAACGTAGC	23	52,2	57,8
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Rh_ory_ITS_rev	GGTAATCCCACCTGACTTCAGATC	24	50	56,8
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Rh_stol_ITS_rev	CCCACCTTGACTTCAGATCATTGATTG	26	42,3	56
SSU	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	ITS_PJ_rev	CCCAGCGAATTTTTACGACACTAGG	25	48	57,8
		<i>Rhizopus oryzae</i>	18S_RhOry_for	GACAATACATAACAATGCAGGGCC	24	45,8
	<i>Rhizopus oryzae</i>	18S_RhOry_rev	CTTTAAGTTTCAGCCTTGCGTC	22	45,5	54,6
LSU	<i>C. orthopsilosis</i> , <i>M. racemosus</i> , <i>L. corymbifera</i>	28S_CO_MR_AC_for	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG	24	41,7	54,2
		28S_CO_MR_AC_rev	CCTTGGTCCGTGTTTCAAGAC	21	52,4	56,2
	<i>Candida albicans</i>	28S_CAlbi_for	GGATGAACCGAACGTGAAGTTAAA	24	41,7	55,5
		28S_CAlbi_rev	TGGCCTGAAAAATCAAGCACG	21	47,6	56,5
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	28S_RhSto_for	GAACCTGAAAACCGTTTAGCG	22	50	56,6
		28S_RhSto_rev	GTAGACTGGGTTCTCTGGA	20	55	55,5
	<i>Arthroderma otae</i>	28S_AOtae_for	GACCACAGTCGGACCGTC	18	66,7	57,9
		28S_AOtae_rev	CAACTGTCTACCAGGCTCG	19	57,9	55,2
	<i>Rhizopus oryzae</i>	28S_RhOry_for	CGCCTTAAGTCAGAATCCATG	22	50	55,2
		28S_RhOry_rev	GCATGCGATTTATCACITTTGATCATTG	28	35,7	55,7
	<i>Candida pulcherrima</i>	28S_CPul_for	GGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTGG	24	54,2	59,5
		28S_CPul_for_2	GTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAG	23	52,2	59
		28S_CPul_rev	CAGCATCCTTAGATTGCAGGCCTC	24	54,2	59,8
	<i>Cryptococcus gattii</i>	Cgattii_28S_REV	CATGTTAGTTGTGTTAAATAGG	23	30,4	47,8
		Cgattii_28S_FOR	CCCCCGCCCATATTCCATTTC	21	57,1	58,4
	Panfungal	28S-FOR	AGACCAGATAGCGMACAAGTA	20	47,5	54,5
		28S-REV	TACTTGTCKCGCTATCGGTCT	20	47,5	54,5
		LR22-FOR	AGCGAACAAGTACCGTGAGG	20	55	57,1
	βtub	<i>Candida famata</i>	βTub_CFam_for	GATGCCACTAGGACGGAC	18	61,1
βTub_CFam_rev			GTATCTAATTCCTGCGTATCGC	23	47,8	55,6
βTub_CFam_for_2			CCGTCGAGATCGGTGATGCC	20	65	60,3
βTub_CFam_rev_2			CCGTGCGTATCGCATGTGG	19	63,2	59,2
<i>Aspergillus fumigatus</i>		Afumi_βtub_FOR	GAATAGCTCGCCGAAGGGAC	20	60	57,9
	Afumi_βtub_REV	GGCTCTGGCCAGTAAGTTTCG	20	60	58,1	
Cal	<i>Fusarium solani</i>	Cal_FusSol_for	CCTGTTCTGAAGTTGTTCTCACTC	24	45,8	55,4
		Cal_FusSol_rev	GATGGAGTTCATAACGTGTGG	22	54,5	57,4
		Cal_FusSol_for_2	CGATGGTGAGTGATTCTCCCTCC	23	56,5	59
		Cal_FusSol_rev_2	GTCGGCCAGGCTTGCAAG	20	65	61,2
	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	Cal_AjDerm_for	GGTAGCTCTTGCACTGTTGC	21	52,4	56,1
		Cal_AjDerm_rev	GTAGTTCTGTTCAACATTCGACAGC	25	44	56,5
	<i>Aspergillus terreus</i>	Cal_AspTer_for	CTTCTCCCTCTTCGTATGTCTTG	23	47,8	54,7
Cal_AspTer_rev		GGAGATGAAACCGTTGTTATCG	22	45,5	53,7	

Zielgen	Spezies	Primer	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
Cal	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cal_SCer_for	GTCCTCCAATCTTACCGAAGAAC	23	47,8	55,1
		Cal_SCer_rev	GCCTTGGAACAATCCGTATCC	23	47,8	55,9
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Afumi_Cal_FOR	TTCCACTCCTCGAACTTCGGC	21	57,1	59,3
		Afumi_Cal_REV	CGGTGTCCTTCATCTCCGAG	21	57,1	57,4
EF-3	<i>Aspergillus flavus</i>	EF3_AFlav_for	CCGTTTAGAGCGTGTCTGTG	21	52,4	56,1
		EF3_AFlav_rev	CCTTGACGTTGGTCATCTTGTC	20	50	55,9
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EF3_AFum_for	GGGTGGTGTCTTATCATTACC	22	50	55,4
		EF3_AFum_rev	CTTCTTCTTCTTCGACAACACTC	25	44	55,3
	<i>Aspergillus niger</i>	EF3_ANig_for	CTTCTAAGAGGTTTGTCTCTATCTTC	28	42,9	56,3
		EF3_ANig_rev	GAACGGACGAAACATCAACAGC	22	50	56,8
	<i>Candida albicans</i>	EF3_CAlbi_for	GATGAAGCTGCTTCCAACATTCC	24	45,8	56,8
		EF3_CAlbi_rev	GATTTGGTCATGGTAGCAGTGG	22	50	55,9
	<i>Candida guilliermondii</i>	EF3_CGuil_for	GAAGAGGTGCTTCTGAGTTGTTG	24	45,8	56,2
		EF3_CGuil_rev	GACAGAAGGAGCCAAGCTGTACC	24	54,2	59,3
	<i>Cryptococcus spp.</i>	EF3_CrGa+CrN_for	GGTTGGAAGATGAAGCTTGCTC	22	50	56,3
		EF3_CrGa+CrN_rev	CTCAAGGTTACCGGGGTAC	19	57,9	54,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EF3_SacCer_for	CACACCCTCTATAAAACCAAAATTGAGG	28	39,3	56,1	
	EF3_SacCer_rev	GTTTCAGAAAGGTATACTACCCCC	24	45,8	55	

Tabelle 52: Veröffentlichte Primer. Quellen: ^a (White et al., 1990), ^b: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>, * Primer des finalen Mikroarrays

Zielgen	Spezies	Primer	Sequenz 5'-3'	bp	GC	Tmp
ITS	Panfungal	ITS 1 ^a *	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	63,2	59,5
		ITS 2 ^a *	GCTGCGTCTTCATCGATGC	20	55	57
		ITS 3 ^a *	GCATCGATGAAGAACGCAGC	20	55	57
		ITS 4 ^a *	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	45	52,1
LSU	Panfungal	NS 1 ^b	GTAGTCATATGCTTGTCTC	19	42,1	47,2
		NS 2 ^b	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	21	66,7	63,9
		NS 3 ^b	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	21	66,7	63,9
		NS 4 ^b	CTTCCGTCAATTCCTTAAG	20	40	48,7
		NS 5 ^b	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	22	36,4	50,9
		NS 6 ^b	GCATCACAGACCTGTATTGCCTC	24	50	58
		NS 7 ^b	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	24	50	58
		NS 8 ^b	TCCGAGGTTACCTACGGA	20	60	60,6
		LROR ^b	ACCCGCTGAACCTAAGC	17	52,9	52,4
		LR22 ^b	CCTCACGGTACTTGTTTCGCT	20	55	57,1
		LR3 ^b	CCGTGTTTCAAGACGGG	17	58,8	53,6
		LR16 ^b	TTCCACCCAAACTCG	17	52,9	52,3

Ergebnisse der Vergleichsstudie von *Single*- und *Multiplex-PCR*

Tabelle 53: Detaillierte Ergebnisse der Vergleichsstudien ohne unspezifische Signale. Die Tabelle zeigt die gemittelten Signalintensitäten der spezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies sowohl von den *Singleplex-PCR* mit den Primerpaare ITS1+2/3+4 bzw. ITS1+4 als auch von der *Multiplex-PCR*. Intensitäten unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt. Zudem sind die zugehörigen Standardabweichungen der Duplikate angegeben.

Spezies	Sonden	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>
	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
<i>Candida famata</i>	L793_Cfam_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	42445 1422	29724 1038	29217 1487
	L792_Cfam_Lä ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0
<i>Candida krusei</i>	I741_C_krusei ITS_rc STABWN (n=2)	53956 368	48213 3072	46329 7251
	I740_C_krusei ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	8 8
<i>Candida pulcherrima</i>	L823_C_pulG2 ITS_rc STABWN (n=2)	35500 13849	27517 2059	18191 2071
	L822_C_pulG2 ITS STABWN (n=2)	86 20	102 54	360 25
<i>Mucor racemosus</i>	L881_Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	23167 4253	57 57	21039 6030
	L880_Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	62 4	22407 3476	86 21
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	M910_Pn_jiro2 ITS_rc STABWN (n=2)	14890 5625	9208 1463	9126 2117
	M909_Pn_jiro2 ITS STABWN (n=2)	4 4	65 49	0 0
<i>Sporothrix schenckii</i>	M934_SpSchenckii ITS1_rc STABWN (n=2)	18771 216	15278 2974	1393 119
	M933_SpSchenckii ITS1 STABWN (n=2)	801 466	24 24	74 32
<i>Candida tropicalis</i>	L831_Can_trop_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	33931 5744	19784 1809	26100 7970
	L830_Can_trop_Lä ITS STABWN (n=2)	16 16	0 0	0 0
<i>Mucor pusillus</i>	L885_Mu_pusi2 ITS_rc STABWN (n=2)	49634 3718	20237 3366	41431 4143
	L884_Mu_pusi2 ITS STABWN (n=2)	70 4	82 0	70 13
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	M904_PaCocBras ITS5_rc STABWN (n=2)	0 0	4106 3984	19666 2803
	M903_PaCocBras ITS5 STABWN (n=2)	36795 1516	363 363	0 0
<i>Rhizopus microsporus</i>	L915_Rhi_microG ITS_rc STABWN (n=2)	40912 21	16524 886	34732 670
	L914_Rhi_microG ITS STABWN (n=2)	74 0	12 4	21 21
<i>Rhodotorula minuta</i>	M922_RhodoMin ITS1_rc STABWN (n=2)	25197 33	11099 6026	18498 2966
	M921_RhodoMin ITS1 STABWN (n=2)	12 12	8 8	4 4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L925_S_cere_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	45 29	3301 278	8743 2059
	L924_S_cere_Lä ITS STABWN (n=2)	26361 1973	209 184	16 8
<i>Candida dubliniensis</i>	L789_Can_dubl_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	12689 6193	7463 445	69 69
	L788_Can_dubl_Lä ITS STABWN (n=2)	4 4	8 8	12071 846
<i>Candida guilliermondii</i>	I735_C_guilG ITS_rc STABWN (n=2)	39385 2374	22407 3035	29625 2974

Spezies	Sonden	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR
	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
<i>Candida guilliermondii</i>	I734_C_guilG ITS	0	50	25
	STABWN (n=2)	0	25	16
<i>Candida parapsilosis</i>	M842_Cpara ITS1_rc	19482	10127	15458
	STABWN (n=2)	282	413	1789
<i>Candida albicans</i>	M841_Cpara ITS1	29	98	82
	STABWN (n=2)	21	9	16
<i>Candida glabrata</i>	G986_Can_albi ITS_rc	2382	2006	127
	STABWN (n=2)	920	576	119
<i>Candida glabrata</i>	G985_Can_albi ITS	25	4	6418
	STABWN (n=2)	9	4	380
<i>Candida lusitanae</i>	I739_C_glab ITS_rc	11197	0	21
	STABWN (n=2)	5103	0	13
<i>Candida lusitanae</i>	I738_C_glab ITS	45	8853	13988
	STABWN (n=2)	45	740	376
<i>Candida lusitanae</i>	L799_Can_lusiG_Lä ITS_rc	7162	1479	53
	STABWN (n=2)	4743	16	4
<i>Candida lusitanae</i>	L798_Can_lusiG_Lä ITS	699	4216	10200
	STABWN (n=2)	699	1177	1344
<i>Candida metapsilosis</i>	M834_CandOrtho ITS1_rc	11030	3481	11921
	STABWN (n=2)	858	719	2386
<i>Candida metapsilosis</i>	M833_CandOrtho ITS1	41	25	0
	STABWN (n=2)	16	25	0
<i>Candida orthopsilosis</i>	M834_CandOrtho ITS1_rc	14661	6692	15197
	STABWN (n=2)	4849	793	3636
<i>Candida orthopsilosis</i>	M833_CandOrtho ITS1	25	4	0
	STABWN (n=2)	25	4	0
<i>Dipodascus capitatus</i>	M880_GeoCapi ITS2_rc	32538	6610	86
	STABWN (n=2)	11721	3603	4
<i>Dipodascus capitatus</i>	M879_GeoCapi ITS2	102	527	33036
	STABWN (n=2)	102	445	7136
<i>Epidermophyton floccosum</i>	L861_Epi_flocc_Lä ITS_rc	14543	9890	24315
	STABWN (n=2)	964	102	3775
<i>Epidermophyton floccosum</i>	L860_Epi_flocc_Lä ITS	33	45	49
	STABWN (n=2)	16	21	8
<i>Mucor hiemalis</i>	L875_Muc_hiemG2_Lä ITS_rc	40206	27317	41623
	STABWN (n=2)	9314	1450	10013
<i>Mucor hiemalis</i>	L874_Muc_hiemG2_Lä ITS	103	98	110
	STABWN (n=2)	21	33	45
<i>Penicillium marneffeii</i>	L909_Pen_marn_Lä ITS_rc	26957	2402	41
	STABWN (n=2)	886	450	8
<i>Penicillium marneffeii</i>	L908_Pen_marn_Lä ITS	69	1152	39977
	STABWN (n=2)	69	1119	8619
<i>Pseudallescheria boydii</i>	M914_PsallBoy ITS4_rc	3995	86	29
	STABWN (n=2)	907	86	21
<i>Pseudallescheria boydii</i>	M913_PsallBoy ITS4	25	621	8661
	STABWN (n=2)	25	302	1389
<i>Trichosporon mucoides</i>	L961_Trspo_mucG2 ITS_rc	18677	9633	37
	STABWN (n=2)	9869	1038	13
<i>Trichosporon mucoides</i>	L960_Trspo_mucG2 ITS	45	49	21962
	STABWN (n=2)	4	9	4403

Tabelle 54: Detaillierte Ergebnisse der Vergleichsstudien mit unspezifischen Signalen. Die Tabelle zeigt die gemittelten Signalintensitäten der spezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies sowohl von den *Singleplex-PCR* mit den Primerpaare ITS1+2/3+4 bzw. ITS1+4 als auch von der *Multiplex-PCR*. Intensitäten unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt. Zudem sind die zugehörigen Standardabweichungen der Duplikate angegeben.

Spezies	spezifische Signale	Sonde	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>
	unspezifische Signale	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
<i>Absidia cylindrospora</i>	spezifische Signale	L719__Abs_cyli_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	11626 4543	17 17	1046 605
		L718__Abs_cyli_Lä ITS STABWN (n=2)	94 29	5834 33	6201 1364
	unspezifische Signale	L729__Aspin ITS_rc STABWN (n=2)	26921 5613	127 70	28702 10082
		L728__Aspin ITS STABWN (n=2)	25 25	1417 53	4 4
<i>Absidia glauca</i>	spezifische Signale	L727__Abs_glau_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	16010 903	5789 486	14927 5613
		L726__Abs_glau_Lä ITS STABWN (n=2)	9 9	12 4	41 32
	unspezifische Signale	L729__Aspin ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	1667 295	1941 682
		L728__Aspin ITS STABWN (n=2)	21 21	0 0	0 0
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	spezifische Signale	L741__Aderm2 ITS_rc STABWN (n=2)	28951 4645	14498 3591	19429 4845
		L740__Aderm2 ITS STABWN (n=2)	37 4	25 17	61 12
	unspezifische Signale	L776__Asp_fumi_Lä ITS STABWN (n=2)	110 21	192 86	2394 98
		L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	49 8	572 474	78 13
<i>Rhizopus oryzae</i>	spezifische Signale	L917__RhiOryG ITS_rc STABWN (n=2)	40724 420	29388 4445	30863 1319
		L916__RhiOryG ITS STABWN (n=2)	24 8	0 0	49 24
	unspezifische Signale	M828_ATerG_NoLä ITS_rc STABWN (n=2)	1050 118	388 94	711 82
		M827_ATerG_NoLä ITS STABWN (n=2)	58 8	62 4	21 21
		L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	65 0	413 53	2333 1066
		L880__Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	49 8	258 86	421 102
<i>Trichophyton rubrum</i>	spezifische Signale	L941__Tphy_rubG3 ITS_rc STABWN (n=2)	8 8	2843 2181	26267 5662
		L940__Tphy_rubG3 ITS STABWN (n=2)	34932 723	220 204	20 12
	unspezifische Signale	L946__Tphy_tonsG ITS STABWN (n=2)	4 4	1838 1005	14841 4073
		L947__Tphy_tonsG ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0
<i>Trichosporon cutaneum</i>	spezifische Signale	L961__Trspo_mucG2 ITS_rc STABWN (n=2)	23445 2749	17974 220	19404 2574
		L960__Trspo_mucG2 ITS STABWN (n=2)	78 29	8 0	21 21
	unspezifische Signale	L947__Tphy_tonsG ITS_rc STABWN (n=2)	16 16	0 0	4 4
		L946__Tphy_tonsG ITS STABWN (n=2)	8 8	0 0	1316 1316
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	spezifische Signale	M886_LichCory ITS_rc STABWN (n=2)	16435 3591	1597 78	12129 3591
		M885_LichCory ITS1 STABWN (n=2)	78 20	302 74	29 12

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR
	unspezifische Signale	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	unspezifische Signale	L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	233 192	106 0	1859 968
		L880__Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	171 123	147 66	1454 57
<i>Candida kefyi</i>	spezifische Signale	G998__Can_kefy ITS_rc STABWN (n=2)	52628 502	23171 23155	15319 8555
		G997__Can_kefy ITS STABWN (n=2)	90 33	8 8	41 41
	unspezifische Signale	L798__Can_lusiG_Lä ITS STABWN (n=2)	16 16	1691 1691	25 0
		L799__Can_lusiG_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	29 4	4 4	8 8
		I741__C_krusei ITS_rc STABWN (n=2)	7659 372	5817 2664	26553 2630
		I740__C_krusei ITS STABWN (n=2)	245 155	4 4	0 0
<i>Rhizopus stolonifer</i>	spezifische Signale	L920__Rhi_stolo_Lä ITS STABWN (n=2)	37 21	37 21	0 0
		L921__Rhi_stolo_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	30871 2888	15242 1924	13722 217
	unspezifische Signale	L880__Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	45 29	315 184	26169 5973
		L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	29 21	217 45	45 4
<i>Trichosporon asahii</i>	spezifische Signale	L955__Tspo_aste_GLä ITS_rc STABWN (n=2)	25957 8954	16226 3023	5887 1156
		L954__Tspo_aste_GLä ITS STABWN (n=2)	33 33	0 0	1365 973
	unspezifische Signale	L729__Aspin ITS_rc STABWN (n=2)	351 17	8 8	1030 131
		L728__Aspin ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0
<i>Trichosporon asteroides</i>	spezifische Signale	L955__Tspo_aste_GLä ITS_rc STABWN (n=2)	13264 6140	8391 359	846 446
		L954__Tspo_aste_GLä ITS STABWN (n=2)	4 4	8 8	6487 2410
	unspezifische Signale	L729__Aspin ITS_rc STABWN (n=2)	184 21	12 12	1368 307
		L728__Aspin ITS STABWN (n=2)	4 4	0 0	0 0
<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	spezifische Signale	M866__CrypG+N ITS2_Lä_rc STABWN (n=2)	31133 756	9457 4302	1230 1107
		M865__CrypG+N ITS2_Lä STABWN (n=2)	0 0	12 12	4261 584
	unspezifische Signale	I741__C_krusei ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	1075 437	2790 20
		I740__C_krusei ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0
<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i>	spezifische Signale	M866__CrypG+N ITS2_Lä_rc STABWN (n=2)	26962 6463	9681 367	8 8
		M865__CrypG+N ITS2_Lä STABWN (n=2)	20 20	0 0	21574 5813
	unspezifische Signale	I741__C_krusei ITS_rc STABWN (n=2)	12 4	1324 229	3133 592
		I740__C_krusei ITS STABWN (n=2)	8 8	0 0	4 4
<i>Absidia caerulea</i>	spezifische Signale	G954__Abs_caer ITS_rc STABWN (n=2)	18064 474	14171 1892	19670 8101
		G953__Abs_caer ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	21 12

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR
	unspezifische Signale	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
<i>Absidia caerulea</i>	unspezifische Signale	L729_Aspin_ITS_rc	25	384	1160
		STABWN (n=2)	25	344	1160
		L728_Aspin_ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	33 16
<i>Absidia spinosa</i>	spezifische Signale	L729_Aspin_ITS_rc STABWN (n=2)	33976 1728	6459 61	43976 8526
		L728_Aspin_ITS STABWN (n=2)	16 16	8 8	37 37
	unspezifische Signale	L881_Mu_pl+ra2_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	1107 37	111 12	2047 1025
		L880_Mu_pl+ra2_Lä_ITS STABWN (n=2)	278 49	433 286	392 32
<i>Arthroderma gypseum</i>	spezifische Signale	M796_Agyp_NoLä_ITS_rc STABWN (n=2)	707 111	7643 380	16623 3771
		M795_Agyp_NoLä_ITS STABWN (n=2)	14518 4477	33 33	46 4
	unspezifische Signale	L946_Tphy_tonsG_ITS STABWN (n=2)	0 0	1491 470	2921 225
		L947_Tphy_tonsG_ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	21 21	12 12
<i>Aspergillus niger</i>	spezifische Signale	L781_AnigG_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	6708 1365	1087 923	4 4
		L780_AnigG_Lä_ITS STABWN (n=2)	0 0	740 699	16541 4784
	unspezifische Signale	L777_Asp_fumi_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	1258 98	184 20	65 0
		L776_Asp_fumi_Lä_ITS STABWN (n=2)	135 61	164 49	4976 491
		M828_ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	37 20	8109 2194	14078 2607
		M827_ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	20 20	25 8	4 4
<i>Aspergillus terreus</i>	spezifische Signale	M828_ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	2104 1704	8931 1316	22480 4415
		M827_ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	22113 11973	37 4	8 8
		L776_Asp_fumi_Lä_ITS STABWN (n=2)	114 49	674 119	1487 229
<i>Aspergillus terreus</i>	unspezifische Signale	L777_Asp_fumi_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	74 57	82 0	54 13
		spezifische Signale	M884_Fus_sol_2_NoLä_ITS_rc STABWN (n=2)	3922 3366	1920 899
M883_Fus_sol_2_NoLä_ITS STABWN (n=2)	919 887		225 135	7541 923	
unspezifische Signale	I741_C_krusei_ITS_rc STABWN (n=2)		0 0	3579 1536	7766 1769
	I740_C_krusei_ITS STABWN (n=2)	0 0	4 4	0 0	
<i>Malassezia furfur</i>	spezifische Signale	M892_Mal_furf_NoLä_ITS_rc STABWN (n=2)	7113 5903	564 98	9 9
		M891_Mal_furf_NoLä_ITS STABWN (n=2)	813 797	245 16	13138 2345
	unspezifische Signale	L776_Asp_fumi_Lä_ITS STABWN (n=2)	172 74	2332 241	2047 478
		L777_Asp_fumi_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	830 764	298 45	396 118
		M828_ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	21 4	1744 421	5576 1654
		M827_ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	21 21	9 9	33 16

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR
	unspezifische Signale	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
<i>Malassezia furfur</i>	unspezifische Signale	L780__AnigG_Lä ITS STABWN (n=2)	49 33	1401 70	1393 429
		L781__AnigG_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	384 384	49 16	57 16
		L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	1422 1405	135 37	7701 2357
		L880__Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	376 302	4522 617	163 24
		L917__RhiOryG ITS_rc STABWN (n=2)	33 25	9085 360	8342 2174
		L916__RhiOryG ITS STABWN (n=2)	33 33	29 4	25 25
		L921__Rhi_stolo_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	1842 160	0 0
		L920__Rhi_stolo_Lä ITS STABWN (n=2)	41 8	12 4	0 0
<i>Mucor plumbeus</i>	spezifische Signale	L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	28808 1373	4587 584	29290 5359
		L880__Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	69 4	37 29	49 24
	unspezifische Signale	L875__Muc_hiemG2_Lä ITS_r c STABWN (n=2)	70 12	874 131	1405 580
		L874__Muc_hiemG2_Lä ITS STABWN (n=2)	65 8	118 12	53 4
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	spezifische Signale	M940__TrichophMenta ITS2_r c STABWN (n=2)	12308 143	10401 1634	14315 1945
		M939__TrichophMenta ITS2 STABWN (n=2)	61 29	62 21	25 16
	unspezifische Signale	L946__Tphy_tonsG ITS STABWN (n=2)	28 12	9437 841	18992 2684
		L947__Tphy_tonsG ITS_rc STABWN (n=2)	12 12	29 29	0 0
		L941__Tphy_rubG3 ITS_rc STABWN (n=2)	18971 2198	15393 4551	24785 3575
		L940__Tphy_rubG3 ITS STABWN (n=2)	20 12	29 4	41 0
<i>Cryptococcus gattii</i>	spezifische Signale	M866__CrypG+N ITS2_Lä_rc STABWN (n=2)	24723 196	4228 4146	0 0
		M865__CrypG+N ITS2_Lä STABWN (n=2)	12 4	2190 2181	30892 3881
	unspezifische Signale	I741__C_krusei ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	1005 1005	3575 184
		I740__C_krusei ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0
<i>Aspergillus flavus</i>	spezifische Signale	L773__AflavG_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	1009 961	94 13	123 49
		L772__AflavG_Lä ITS STABWN (n=2)	1814 1756	8133 159	13906 3015
	unspezifische Signale	L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	1912 1880	82 8	118 53
		L776__Asp_fumi_Lä ITS STABWN (n=2)	715 551	5131 212	11479 1724
<i>Aspergillus fumigatus</i>	spezifische Signale	L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	2357 2153	78 53	127 5
		L776__Asp_fumi_Lä ITS STABWN (n=2)	1430 1283	7116 1373	16794 4147
	unspezifische Signale	M828__ATerG_NoLä ITS STABWN (n=2)	37 12	90 33	1111 33
		M827__ATerG_NoLä ITS STABWN (n=2)	16 16	53 21	12 12

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR
	unspezifische Signale	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4
<i>Aspergillus fumigatus</i>	unspezifische Signale	L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc	379	86	1128
		STABWN (n=2)	20	29	507
<i>Trichophyton tonsurans</i>	spezifische Signale	L880__Mu_pl+ra2_Lä ITS	514	617	478
		STABWN (n=2)	155	12	176
	unspezifische Signale	L947__Tphy_tonsG ITS_rc	4114	0	0
		STABWN (n=2)	3305	0	0
		L941__Tphy_rubG3 ITS_rc	21	6144	24609
		STABWN (n=2)	4	842	6593
		L940__Tphy_rubG3 ITS	8	4	25
		STABWN (n=2)	0	4	25
M940_TrichophMenta ITS2_r c	49	8125	18126		
STABWN (n=2)	8	2472	4881		
M939_TrichophMenta ITS2	58	29	37		
STABWN (n=2)	8	29	12		

Sensitivität durch *Nested-PCR*

Tabelle 55: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *A. terreus*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung angegeben, die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt.

Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Erste PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	M827_ATerG_NoLä_ITS Stabwn (n=2)	893 101	1.003 73	109 109	105 48	61 45	40 32
	M827_ATerG_NoLä_ITS_rc Stabwn (n=2)	9.163 1.968	1.475 4	53 53	52 28	0 0	8 8
Unspezifische Signale	L776_Asp_fumi_Lä_ITS Stabwn (n=2)	2.441 671	133 29	113 48	28 12	53 45	77 53
	L777_Asp_fumi_Lä_ITS_rc Stabwn (n=2)	16 0	0 0	16 16	0 0	0 0	0 0
Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Zweite PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	M827_ATerG_NoLä_ITS Stabwn (n=2)	125 45	69 20	93 28	101 4	473 360	33.610 19.093
	M827_ATerG_NoLä_ITS_rc Stabwn (n=2)	45.791 2.951	45.913 3.331	39.587 699	46.159 2.672	27.964 6.172	707 707
Unspezifische Signale	L776_Asp_fumi_Lä_ITS Stabwn (n=2)	0 0	0 0	73 25	28 4	8 8	138 49
	L777_Asp_fumi_Lä_ITS_rc Stabwn (n=2)	607 129	380 16	12 12	0 0	0 0	0 0

Tabelle 56: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *C. krusei*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung angegeben, die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt.

Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Erste PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	I740_C_krusei_ITS Stabwn (n=2)	49 25	154 121	24 8	0 0	0 0	20 20
	I741_C_krusei_ITS_rc Stabwn (n=2)	27.843 4191	1.900 218	145 56	12 12	97 33	81 16
Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Zweite PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	I740_C_krusei_ITS Stabwn (n=2)	0 0	12 12	48 24	154 65	118 101	3.351 3.327
	I741_C_krusei_ITS_rc Stabwn (n=2)	51.587 1.107	51.365 836	51.761 2.14	49.760 897	49.611 1.871	19.549 17.528

Tabelle 57: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *C. parapsilosis*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung angegeben, die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt.

Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Erste PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	M841_Cpara_ITS1	53	73	32	21	40	0
	Stabwn (n=2)	12	24	8	21	8	0
	M842_Cpara_ITS1_rc	720	28	24	24	44	29
	Stabwn (n=2)	16	12	0	0	12	29
Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Zweite PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	M841_Cpara_ITS1	109	36	0	12	36	8.233
	Stabwn (n=2)	61	20	0	12	4	3.593
	M842_Cpara_ITS1_rc	13.810	13.273	12.124	10.828	4.632	126
	Stabwn (n=2)	885	308	582	796	428	4

Tabelle 58: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *A. flavus*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung angegeben, die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt.

Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Erste PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	L772__AflavG_Lä_ITS	15.184	3.880	0	0	8	8
	Stabwn (n=2)	456	2.239	0	0	8	8
	L773__AflavG_Lä_ITS_rc	0	32	28	12	8	64
	Stabwn (n=2)	0	8	4	12	8	32
Unspezifische Signale	L776__Asp_fumi_Lä_ITS	5.674	1.362	77	53	77	32
	Stabwn (n=2)	493	699	12	53	37	8
	L777__Asp_fumi_Lä_ITS_rc	12	0	0	0	0	0
	Stabwn (n=2)	12	0	0	0	0	0
Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Zweite PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	L772__AflavG_Lä_ITS	4	0	0	0	0	0
	Stabwn (n=2)	4	0	0	0	0	0
	L773__AflavG_Lä_ITS_rc	10.843	12.808	12.537	14.675	11.870	5.554
	Stabwn (n=2)	125	2.324	258	1.184	1.265	3.145
Unspezifische Signale	L776__Asp_fumi_Lä_ITS	52	49	21	49	41	93
	Stabwn (n=2)	20	9	13	32	24	4
	L777__Asp_fumi_Lä_ITS_rc	16.413	18.786	18.224	20.851	16.846	7.821
	Stabwn (n=2)	295	1.003	1.224	1.629	2.627	4.353
	L956__Trsp_cutaG_LÄ_ITS	8	0	49	311	0	0
	Stabwn (n=2)	8	0	49	311	0	0
	L957__Trsp_cutaG_LÄ_ITS_rc	41	0	109	2.017	17	8
	Stabwn (n=2)	41	0	109	2.017	9	8
L960__Trspo_mucG2_ITS	20	0	41	392	8	0	
Stabwn (n=2)	20	0	25	392	8	0	
L961__Trspo_mucG2_ITS_rc	105	49	138	2.498	93	4	
Stabwn (n=2)	97	40	57	2.498	4	4	

Tabelle 59: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *C. tropicalis*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung angegeben, die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt.

Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Erste PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	L830__Can_trop_Lä ITS	40	12	12	8	32	16
	Stabwn (n=2)	40	12	12	8	8	8
	L831__Can_trop_Lä ITS_rc	5666	299	16	8	0	4
	Stabwn (n=2)	2514	81	0	8	0	4
Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Zweite PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	L830__Can_trop_Lä ITS	40	24	20	8	29	2037
	Stabwn (n=2)	24	16	12	8	4	1609
	L831__Can_trop_Lä ITS_rc	37373	38876	37130	33889	21849	4770
	Stabwn (n=2)	5581	6454	1443	813	525	3088

Tabelle 60: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *A. fumigatus*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung angegeben, die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt.

Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Erste PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	L776__Asp_fumi_Lä ITS	2304	166	60	105	33	73
	Stabwn (n=2)	429	20	20	16	8	16
	L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc	0	0	0	0	0	0
	Stabwn (n=2)	0	0	0	0	0	0
Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Zweite PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	L776__Asp_fumi_Lä ITS	73	16	36	77	61	85
	Stabwn (n=2)	33	0	28	29	61	20
	L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc	12602	13968	14210	16219	10229	3585
	Stabwn (n=2)	347	2134	776	3245	1572	748
Unspezifische Signale	I738__C_glab ITS	81	12	36	53	28	72
	Stabwn (n=2)	9	4	12	45	12	16
	I739__C_glab ITS_rc	16	36	0	1463	0	16
	Stabwn (n=2)	16	12	0	1423	0	16
	G985__Can_albi ITS	0	0	0	0	36	4
	Stabwn (n=2)	0	0	0	0	36	4
	G986__Can_albi ITS_rc	69	40	93	36	615	3746
	Stabwn (n=2)	60	8	77	20	558	3569
L840__CocGenus2 ITS	0	0	8	0	0	0	
Stabwn (n=2)	0	8	0	0	0	0	
L841__CocGenus2 ITS_rc	137	267	643	1201	485	16	
Stabwn (n=2)	72	89	376	659	477	16	

Tabelle 61: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *C. albicans*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung angegeben, die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt. Ausnahmen stellen die unspezifischen Signale bei 10^2 Molekülen der Sonden L946__Tphy_tonG ITS und L957__Trsp_cutaG_LÄ ITS_rc dar: je ein Replikatswert lag über 1000 a.u. und wird in dieser Tabelle nicht in grau dargestellt.

Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Erste PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	G985__Can_albi ITS Stabwn (n=2)	7582 1431	1589 61	44 4	4 4	8 8	8 8
	G986__Can_albi ITS_rc Stabwn (n=2)	57 24	106 40	76 36	101 44	49 41	158 20
Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Zweite PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	G985__Can_albi ITS Stabwn (n=2)	0 0	8 8	0 0	0 0	45 45	0 0
	G986__Can_albi ITS_rc Stabwn (n=2)	5788 8	5545 194	7065 275	8278 477	7995 372	6588 574
	L960__Trspo_mucG2 ITS Stabwn (n=2)	0 0	0 0	8 8	307 307	0 0	0 0
	L961__Trspo_mucG2 ITS_rc Stabwn (n=2)	40 16	97 49	105 57	1043 1027	65 16	28 28

Tabelle 62: Signalintensitäten der hybridisierten PCR-Produkte der *Nested-PCR* von *C. glabrata*, die auf dem Mikroarray ermittelt werden konnten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und die zugehörige Standardabweichung angegeben, die durch Hybridisierung der zweiten PCR-Produkte nach Verwendung von 10^5 - 10^0 DNA-Molekülen als Template ermittelt werden konnten. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt.

Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Erste PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	I738__C_glab ITS Stabwn (n=2)	388 105	53 12	8 8	49 8	24 8	65 65
	I739__C_glab ITS_rc Stabwn (n=2)	0 0	16 16	20 20	49 25	12 12	57 41
Spezifische/ unspezifische Signale	Sonde	Zweite PCR					
	Stabwn (n=2)	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
Spezifische Signale	I738__C_glab ITS Stabwn (n=2)	65 57	0 0	101 36	12 12	60 12	65 48
	I739__C_glab ITS_rc Stabwn (n=2)	13867 85	20544 3795	15480 3371	16611 1892	10637 3492	4 4

Tabelle 63: Detaillierte Ergebnisse der *Nested-PCR* verglichen mit den Ergebnissen der Vergleichsstudie von *Single-* und *Multiplex-PCR* ohne unspezifische Signale. Die Tabelle zeigt die gemittelten Signalintensitäten der spezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies sowie die zugehörige Standardabweichung. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt.

Spezies	Sonde	<i>Singleplex-PCR</i>		<i>Multiplex-PCR</i>	<i>Nested-PCR</i>
	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Candida famata</i>	L793_Cfam_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	42445 1422	29724 1038	29217 1487	52234 97
	L792_Cfam_Lä ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Candida krusei</i>	I741_C_krusei ITS_rc STABWN (n=2)	53956 368	48213 3072	46329 7251	53737 218
	I740_C_krusei ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	8 8	16 16
<i>Candida pulcherrima</i>	L823_C_pulG2 ITS_rc STABWN (n=2)	35500 13849	27517 2059	18191 2071	49975 739
	L822_C_pulG2 ITS STABWN (n=2)	86 20	102 54	360 25	0 0
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	M910_Pn_jiro2 ITS_rc STABWN (n=2)	14890 5625	9208 1463	9126 2117	45759 1601
	M909_Pn_jiro2 ITS STABWN (n=2)	4 4	65 49	0 0	49 49
<i>Sporothrix schenckii</i>	M934_SpSchenckii ITS1_rc STABWN (n=2)	18771 216	15278 2974	1393 119	53777 332
	M933_SpSchenckii ITS1 STABWN (n=2)	801 466	24 24	74 32	8 8
<i>Candida tropicalis</i>	L831_Can_trop_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	33931 5744	19784 1809	26100 7970	53086 45
	L830_Can_trop_Lä ITS STABWN (n=2)	16 16	0 0	0 0	20 20
<i>Mucor pusillus</i>	L885_Mu_pusi2 ITS_rc STABWN (n=2)	49634 3718	20237 3366	41431 4143	53163 194
	L884_Mu_pusi2 ITS STABWN (n=2)	70 4	82 0	70 13	0 0
<i>Rhizopus microsporus</i>	L915_Rhi_microG ITS_rc STABWN (n=2)	40912 21	16524 886	34732 670	51555 129
	L914_Rhi_microG ITS STABWN (n=2)	74 0	12 4	21 21	12 12
<i>Rhodotorula minuta</i>	M922_RhodoMin ITS1_rc STABWN (n=2)	25197 33	11099 6026	18498 2966	33428 4046
	M921_RhodoMin ITS1 STABWN (n=2)	12 12	8 8	4 4	13 13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L925_S_cere_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	45 29	3301 278	8743 2059	24978 5618
	L924_S_cere_Lä ITS STABWN (n=2)	26361 1973	209 184	16 8	33 0
<i>Candida dubliniensis</i>	L789_Can_dubl_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	12689 6193	7463 445	69 69	30546 3185
	L788_Can_dubl_Lä ITS STABWN (n=2)	4 4	8 8	12071 846	69 20
<i>Candida parapsilosis</i>	M842_Cpara ITS1_rc STABWN (n=2)	19482 282	10127 413	15458 1789	25709 1006
	M841_Cpara ITS1 STABWN (n=2)	29 21	98 9	82 16	12 4
<i>Candida albicans</i>	G986_Can_albi ITS_rc STABWN (n=2)	2382 920	2006 576	127 119	6297 776
	G985_Can_albi ITS STABWN (n=2)	25 9	4 4	6418 380	8 8
<i>Candida glabrata</i>	I739_C_glab ITS_rc STABWN (n=2)	11197 5103	0 0	21 13	23154 4773
	I738_C_glab ITS STABWN (n=2)	45 45	8853 740	13988 376	40 32

Spezies	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR	Nested-PCR
	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Candida lusitanae</i>	L799_Can_lusiG_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	7162 4743	1479 16	53 4	21068 1136
	L798_Can_lusiG_Lä ITS STABWN (n=2)	699 699	4216 1177	10200 1344	109 28
<i>Candida metapsilosis</i>	M834_CandOrtho ITS1_rc STABWN (n=2)	11030 858	3481 719	11921 2386	27608 1225
	M833_CandOrtho ITS1 STABWN (n=2)	41 16	25 25	0 0	53 13
<i>Candida orthopsilosis</i>	M834_CandOrtho ITS1_rc STABWN (n=2)	14661 4849	6692 793	15197 3636	31843 5210
	M833_CandOrtho ITS1 STABWN (n=2)	25 25	4 4	0 0	65 49
<i>Dipodascus capitatus</i>	M880_GeoCapi ITS2_rc STABWN (n=2)	32538 11721	6610 3603	86 4	50746 614
	M879_GeoCapi ITS2 STABWN (n=2)	102 102	527 445	33036 7136	16 16
<i>Mucor hiemalis</i>	L875_Muc_hiemG2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	40206 9314	27317 1450	41623 10013	49404 881
	L874_Muc_hiemG2_Lä ITS STABWN (n=2)	103 21	98 33	110 45	28 28
<i>Penicillium marneffei</i>	L909_Pen_marn_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	26957 886	2402 450	41 8	23938 5816
	L908_Pen_marn_Lä ITS STABWN (n=2)	69 69	1152 1119	39977 8619	339 299
<i>Pseudallescheria boydii</i>	M914_PsallBoy ITS4_rc STABWN (n=2)	3995 907	86 86	29 21	2029 356
	M913_PsallBoy ITS4 STABWN (n=2)	25 25	621 302	8661 1389	449 69
<i>Trichosporon mucoides</i>	L961_Trspo_mucG2 ITS_rc STABWN (n=2)	18677 9869	9633 1038	37 13	40690 7057
	L960_Trspo_mucG2 ITS STABWN (n=2)	45 4	49 9	21962 4403	24 24

Tabelle 64: Detaillierte Ergebnisse der *Nested-PCR* verglichen mit den Ergebnissen der Vergleichsstudie von *Single-* und *Multiplex-PCR* mit zusätzlichen unspezifischen Signalen durch die *Nested-PCR*. Die Tabelle zeigt die gemittelten Signalintensitäten der spezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies sowie die zugehörige Standardabweichung. Intensitätswerte von Sonden unter 1000 a.u. sind in grauer Schrift dargestellt.

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR	Nested-PCR
	unspezifische Signale	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Candida guilliermondii</i>	spezifische Signale	I735_C_guilG ITS_rc STABWN (n=2)	39385 2374	22407 3035	29625 2974	47093 510
		I734_C_guilG ITS STABWN (n=2)	0 0	50 25	25 16	0 0
	unspezifische Signale	L793_Cfam_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	927 364	66 17	703 286	3391 893
		L792_Cfam_Lä ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0	4 4
<i>Epidermophyton floccosum</i>	spezifische Signale	L861_Epi_flocc_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	14543 964	9890 102	24315 3775	47044 4648
		L860_Epi_flocc_Lä ITS STABWN (n=2)	33 16	45 21	49 8	56 8
	unspezifische Signale	L831_Can_trop_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	4 4	4 4	0 0	7158 1184
		L830_Can_trop_Lä ITS STABWN (n=2)	17 17	0 0	0 0	279 125

Spezies	spezifische Signale	Sonde Stabwn (n=2)	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR	Nested-PCR
	unspezifische Signale		ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Mucor racemosus</i>	spezifische Signale	L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	23167	57	21039	36023
		L880__Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	4253	57	6030	1815
	unspezifische Signale	L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	62	22407	86	44
		L776__Asp_fumi_Lä ITS STABWN (n=2)	4	3476	21	36
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	spezifische Signale	M904__PaCocBras ITS5_rc STABWN (n=2)	45	49	41	3682
		M903__PaCocBras ITS5 STABWN (n=2)	20	8	53	392
	unspezifische Signale	L741__Aderm2 ITS_rc STABWN (n=2)	70	57	74	158
		L740__Aderm2 ITS STABWN (n=2)	0	25	37	109
		M904__PaCocBras ITS5_rc STABWN (n=2)	0	4106	19666	52165
		M903__PaCocBras ITS5 STABWN (n=2)	0	3984	2803	602
unspezifische Signale	L741__Aderm2 ITS_rc STABWN (n=2)	16	4	29	1556	
	L740__Aderm2 ITS STABWN (n=2)	16	4	13	150	
	L741__Aderm2 ITS_rc STABWN (n=2)	16	0	0	81	
	L740__Aderm2 ITS STABWN (n=2)	16	0	0	57	

Tabelle 65: Detaillierte Ergebnisse der Nested-PCR verglichen mit den Ergebnissen der Vergleichsstudie von Single- und Multiplex-PCR mit unspezifischen Signalen. Die Tabelle zeigt die Signalintensitäten der spezifischen und unspezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies. Signale, die durch die drei PCR-Protokolle erreicht wurden, sind nach ihrer Intensität in geringste Intensität (+), mittlere Intensität (++), hohe Intensität (+++) und höchste Intensität (++++) für jede Spezies unterteilt. Grau unterlegte Felder repräsentieren das Protokoll mit der höchsten Signalintensität unspezifischer Sonden. Zeigen mehrere unspezifische Sonden die maximale Intensität nach Verwendung unterschiedlicher Protokolle, sind mehrere Felder innerhalb einer Spezies grau unterlegt.

Spezies	spezifische Signale	Sonde Stabwn (n=2)	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR	Nested-PCR
	unspezifische Signale		ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Absidia spinosa</i>	spezifische Signale	L729__Aspin ITS_rc STABWN (n=2)	33976	6459	43976	45589
		L728__Aspin ITS STABWN (n=2)	1728	61	8526	4373
	unspezifische Signale	L881__Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	16	8	37	8
		L880__Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	16	8	37	8
<i>Aspergillus terreus</i>	spezifische Signale	M828_ATerG_NoLä ITS STABWN (n=2)	1107	111	2047	1981
		M827_ATerG_NoLä ITS STABWN (n=2)	37	12	1025	275
	unspezifische Signale	L776__Asp_fumi_Lä ITS STABWN (n=2)	278	433	392	1629
		L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	49	286	32	4
		M828_ATerG_NoLä ITS STABWN (n=2)	2104	8931	22480	47218
		M827_ATerG_NoLä ITS STABWN (n=2)	1704	1316	4415	3391
unspezifische Signale	L776__Asp_fumi_Lä ITS STABWN (n=2)	22113	37	8	89	
	L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	11973	4	8	40	
	L776__Asp_fumi_Lä ITS STABWN (n=2)	114	674	1487	73	
	L777__Asp_fumi_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	49	119	229	57	
<i>Trichosporon cutaneum</i>	spezifische Signale	L961__Trspo_mucG2 ITS_rc STABWN (n=2)	74	82	54	679
		L960__Trspo_mucG2 ITS STABWN (n=2)	57	0	13	146
	unspezifische Signale	L961__Trspo_mucG2 ITS_rc STABWN (n=2)	23445	17974	19404	33380
		L960__Trspo_mucG2 ITS STABWN (n=2)	2749	220	2574	4604
		L947__Tphy_tonsG ITS_rc STABWN (n=2)	78	8	21	0
		L946__Tphy_tonsG ITS STABWN (n=2)	29	0	21	0
spezifische Signale	L947__Tphy_tonsG ITS_rc STABWN (n=2)	16	0	4	0	
	L946__Tphy_tonsG ITS STABWN (n=2)	16	0	4	0	
	L955__Tspo_aste_GLä ITS_rc STABWN (n=2)	8	0	1316	20	
	L954__Tspo_aste_GLä ITS STABWN (n=2)	8	0	1316	4	
<i>Trichosporon asahii</i>	spezifische Signale	L955__Tspo_aste_GLä ITS_rc STABWN (n=2)	25957	16226	5887	36402
		L954__Tspo_aste_GLä ITS STABWN (n=2)	8954	3023	1156	626
	unspezifische Signale	L955__Tspo_aste_GLä ITS_rc STABWN (n=2)	33	0	1365	48
		L954__Tspo_aste_GLä ITS STABWN (n=2)	33	0	973	40

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR	Nested-PCR
	unspezifische Signale	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Trichosporon asahii</i>	unspezifische Signale	L729__Aspin_ITS_rc STABWN (n=2)	351 17	8 8	1030 131	805 214
		L728__Aspin_ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0	21 12
<i>Trichosporon asteroides</i>	spezifische Signale	L955__Tspo_aste_GLä_ITS_rc STABWN (n=2)	25957 8954	16226 3023	5887 1156	36402 626
		L954__Tspo_aste_GLä_ITS STABWN (n=2)	33 33	0 0	1365 973	48 40
	unspezifische Signale	L729__Aspin_ITS_rc STABWN (n=2)	351 17	8 8	1030 131	805 214
		L728__Aspin_ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0	21 12
<i>Cryptococcus neoformans var. grubii</i>	spezifische Signale	M866__CrypG+N_ITS2_Lä_rc STABWN (n=2)	31133 756	9457 4302	1230 1107	32006 4078
		M865__CrypG+N_ITS2_Lä STABWN (n=2)	0 0	12 12	4261 584	17 17
	unspezifische Signale	I741__C_krusei_ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	1075 437	2790 20	36 4
		I740__C_krusei_ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0	12 12
<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i>	spezifische Signale	M866__CrypG+N_ITS2_Lä_rc STABWN (n=2)	26962 6463	9681 367	8 8	28089 2368
		M865__CrypG+N_ITS2_Lä STABWN (n=2)	20 20	0 0	21574 5813	45 20
<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i>	unspezifische Signale	I741__C_krusei_ITS_rc STABWN (n=2)	12 4	1324 229	3133 592	0 24
		I740__C_krusei_ITS STABWN (n=2)	8 8	0 0	4 4	40 0
<i>Fusarium solani</i>	spezifische Signale	M884__Fus_sol_2_NoLä_ITS_rc STABWN (n=2)	3922 3366	1920 899	12 12	8544 550
		M883__Fus_sol_2_NoLä_ITS STABWN (n=2)	919 887	225 135	7541 923	683 230
	unspezifische Signale	I741__C_krusei_ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	3579 1536	7766 1769	93 18
		I740__C_krusei_ITS STABWN (n=2)	0 0	4 4	0 0	20 8
<i>Aspergillus niger</i>	spezifische Signale	L781__AnigG_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	6708 1365	1087 923	4 4	8976 93
		L780__AnigG_Lä_ITS STABWN (n=2)	0 0	740 699	16541 4784	344 182
<i>Aspergillus niger</i>	unspezifische Signale	L777__Asp_fumi_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	1258 98	184 20	65 0	3589 1059
		L776__Asp_fumi_Lä_ITS STABWN (n=2)	135 61	164 49	4976 491	360 134
		M828__ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	37 20	8109 2194	14078 2607	239 4
		M827__ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	20 20	25 8	4 4	1031 101
<i>Cryptococcus gattii</i>	spezifische Signale	M866__CrypG+N_ITS2_Lä_rc STABWN (n=2)	24723 196	4228 4146	0 0	26080 1419
		M865__CrypG+N_ITS2_Lä STABWN (n=2)	12 4	2190 2181	30892 3881	489 20
	unspezifische Signale	I741__C_krusei_ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	1005 1005	3575 184	41 21
		I740__C_krusei_ITS STABWN (n=2)	0 0	0 0	0 0	117 16
<i>Aspergillus fumigatus</i>	spezifische Signale	L777__Asp_fumi_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	2357 2153	78 53	127 5	11171 2700
		L776__Asp_fumi_Lä_ITS STABWN (n=2)	1430 1283	7116 1373	16794 4147	1657 315

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR	Nested-PCR
	unspezifische Signale	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	unspezifische Signale	M828_ATerG_NoLä ITS STABWN (n=2)	37 12	90 33	1111 33	45 20
		M827_ATerG_NoLä ITS STABWN (n=2)	16 16	53 21	12 12	16 16
		L881_Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	379 20	86 29	1128 507	905 453
		L880_Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	514 155	617 12	478 176	610 368
<i>Aspergillus flavus</i>	spezifische Signale	L773_AflavG_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	1009 961	94 13	123 49	5456 784
		L772_AflavG_Lä ITS STABWN (n=2)	1814 1756	8133 159	13906 3015	893 125
	unspezifische Signale	L777_Asp_fumi_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	1912 1880	82 8	118 53	9748 1819
		L776_Asp_fumi_Lä ITS STABWN (n=2)	715 551	5131 212	11479 1724	974 44
<i>Candida kefyr</i>	spezifische Signale	G998_Can_kefy ITS_rc STABWN (n=2)	52628 502	23171 23155	15319 8555	52832 1018
		G997_Can_kefy ITS STABWN (n=2)	90 33	8 8	41 41	41 1
	unspezifische Signale	L798_Can_lusiG_Lä ITS STABWN (n=2)	16 16	1691 1691	25 0	16 8
		L799_Can_lusiG_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	29 4	4 4	8 8	57 0
		I741_C_krusei ITS_rc STABWN (n=2)	7659 372	5817 2664	26553 2630	41026 4797
		I740_C_krusei ITS STABWN (n=2)	245 155	4 4	0 0	0 0
<i>Absidia cylindrospora</i>	spezifische Signale	L719_Abs_cyli_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	11626 4543	17 17	1046 605	29799 11167
		L718_Abs_cyli_Lä ITS STABWN (n=2)	94 29	5834 33	6201 1364	45 12
<i>Absidia cylindrospora</i>	unspezifische Signale	L729_Aspin ITS_rc STABWN (n=2)	26921 5613	127 70	28702 10082	50342 2320
		L728_Aspin ITS STABWN (n=2)	25 25	1417 53	4 4	24 8
<i>Absidia glauca</i>	spezifische Signale	L727_Abs_glau_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	16010 903	5789 486	14927 5613	37320 3282
		L726_Abs_glau_Lä ITS STABWN (n=2)	9 9	12 4	41 32	8 8
	unspezifische Signale	L729_Aspin ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	1667 295	1941 682	2935 1188
		L728_Aspin ITS STABWN (n=2)	21 21	0 0	0 0	0 0
<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	spezifische Signale	L741_Aderm2 ITS_rc STABWN (n=2)	28951 4645	14498 3591	19429 4845	45569 5484
		L740_Aderm2 ITS STABWN (n=2)	37 4	25 17	61 12	0 0
	unspezifische Signale	L776_Asp_fumi_Lä ITS STABWN (n=2)	110 21	192 86	2394 98	8685 4
		L777_Asp_fumi_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	49 8	572 474	78 13	32 24
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	spezifische Signale	M886_LichCory ITS_rc STABWN (n=2)	16435 3591	1597 78	12129 3591	29209 877
		M885_LichCory ITS1 STABWN (n=2)	78 20	302 74	29 12	33 8
	unspezifische Signale	L881_Mu_pl+ra2_Lä ITS_rc STABWN (n=2)	233 192	106 0	1859 968	2425 48
		L880_Mu_pl+ra2_Lä ITS STABWN (n=2)	171 123	147 66	1454 57	1690 598

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR	Nested-PCR
	unspezifische Signale		Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	
<i>Absidia caerulea</i>	spezifische Signale	G954_Abs_caer_ITS_rc	18064	14171	19670	40650
		STABWN (n=2)	474	1892	8101	2150
	unspezifische Signale	G953_Abs_caer_ITS	0	0	21	12
		STABWN (n=2)	0	0	12	4
		L729_Aspin_ITS_rc	25	384	1160	2182
		STABWN (n=2)	25	344	1160	323
L728_Aspin_ITS	0	0	33	125		
STABWN (n=2)	0	0	16	13		

Tabelle 66: Detaillierte Ergebnisse der *Nested-PCR* verglichen mit den Ergebnissen der Vergleichsstudie von *Single-* und *Multiplex-PCR* mit abweichenden unspezifischen Signalen. Die Tabelle zeigt die Signalintensitäten der spezifischen und unspezifischen Sonden der jeweiligen hybridisierten Spezies. Signale, die durch die vier PCR-Protokolle erreicht wurden, sind nach ihrer Intensität in geringste Intensität (+), mittlere Intensität (++) , hohe Intensität (+++) und höchste Intensität (++++) für jede Spezies unterteilt.

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multiplex-PCR	Nested-PCR
	unspezifische Signale		Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	
<i>Arthroderma gypseum</i>	spezifische Signale	M796_Agyp_NoLä_ITS_rc	707	7643	16623	46357
		STABWN (n=2)	111	380	3771	380
<i>Arthroderma gypseum</i>	unspezifische Signale	M795_Agyp_NoLä_ITS	14518	33	46	12
		STABWN (n=2)	4477	33	4	4
		L946_Tphy_tonsG_ITS	0	1491	2921	41
		STABWN (n=2)	0	470	225	0
		L947_Tphy_tonsG_ITS_rc	0	21	12	130
		STABWN (n=2)	0	21	12	16
<i>Rhizopus stolonifer</i>	unspezifische Signale	M800_ArOta_ITS2_rc	0	0	8	1318
		STABWN (n=2)	0	0	8	97
		M799_ArOta_ITS2	12	17	0	53
		STABWN (n=2)	4	17	0	20
		L920_Rhi_stolo_Lä_ITS	37	37	0	51502
		STABWN (n=2)	21	21	0	837
<i>Trichophyton rubrum</i>	unspezifische Signale	L921_Rhi_stolo_Lä_ITS_rc	30871	15242	13722	4
		STABWN (n=2)	2888	1924	217	4
		L880_Mu_pl+ra2_Lä_ITS	45	315	26169	158
		STABWN (n=2)	29	184	5973	77
		L881_Mu_pl+ra2_Lä_ITS_rc	29	217	45	0
		STABWN (n=2)	21	45	4	0
<i>Trichophyton rubrum</i>	spezifische Signale	L917_RhiOryG_ITS_rc	147	50	266	1358
		STABWN (n=2)	57	25	53	251
		L916_RhiOryG_ITS	33	8	16	48
		STABWN (n=2)	17	8	8	8
		L941_Tphy_rubG3_ITS_rc	8	2843	26267	38193
		STABWN (n=2)	8	2181	5662	6450
<i>Trichophyton rubrum</i>	unspezifische Signale	L940_Tphy_rubG3_ITS	34932	220	20	20
		STABWN (n=2)	723	204	12	20
		L946_Tphy_tonsG_ITS	4	1838	14841	239
		STABWN (n=2)	4	1005	4073	28
		L947_Tphy_tonsG_ITS_rc	0	0	0	659
		STABWN (n=2)	0	0	0	44
<i>Trichophyton rubrum</i>	spezifische Signale	M800_ArOta_ITS2_rc	0	70	29	1330
		STABWN (n=2)	0	61	29	360
		M799_ArOta_ITS2	12	74	8	69
		STABWN (n=2)	4	41	8	4

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multi-plex-PCR	Nested-PCR		
	unspezifische Signale	Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	ITS 1+2+3+4			
<i>Trichophyton rubrum</i>	unspezifische Signale	M834_CandOrtho_ITS1_rc STABWN (n=2)	0 0	0 0	17 17	3472 69		
		M833_CandOrtho_ITS1 STABWN (n=2)	21 21	86 12	74 8	49 41		
		M892_Mal_furf_NoLä_ITS_rc STABWN (n=2)	7113 5903	564 98	9 9	3076 327		
<i>Malassezia furfur</i>	spezifische Signale	M891_Mal_furf_NoLä_ITS STABWN (n=2)	813 797	245 16	13138 2345	1924 792		
		L776_Asp_fumi_Lä_ITS STABWN (n=2)	172 74	2332 241	2047 478	6434 1399		
	unspezifische Signale	L777_Asp_fumi_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	830 764	298 45	396 118	1548 1038		
		M828_ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	21 4	1744 421	5576 1654	73 16		
		M827_ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	21 21	9 9	33 16	0 0		
		L780_AnigG_Lä_ITS STABWN (n=2)	49 33	1401 70	1393 429	1742 271		
		L781_AnigG_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	384 384	49 16	57 16	910 618		
		L881_Mu_pl+ra2_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	1422 1405	135 37	7701 2357	12509 1612		
		L880_Mu_pl+ra2_Lä_ITS STABWN (n=2)	376 302	4522 617	163 24	3573 1503		
		L917_RhiOryG_ITS_rc STABWN (n=2)	33 25	9085 360	8342 2174	69 12		
		L916_RhiOryG_ITS STABWN (n=2)	33 33	29 4	25 25	105 9		
		L921_Rhi_stolo_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	0 0	1842 160	0 0	49 49		
		L920_Rhi_stolo_Lä_ITS STABWN (n=2)	41 8	12 4	0 0	0 0		
		<i>Mucor plumbeus</i>	spezifische Signale	L881_Mu_pl+ra2_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	28808 1373	4587 584	29290 5359	36023 1815
				L880_Mu_pl+ra2_Lä_ITS STABWN (n=2)	69 4	37 29	49 24	44 36
			unspezifische Signale	L875_Muc_hiemG2_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	70 12	874 131	1405 580	0 0
L874_Muc_hiemG2_Lä_ITS STABWN (n=2)	65 8			118 12	53 4	105 32		
L777_Asp_fumi_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	57 57			82 0	111 29	3682 392		
L776_Asp_fumi_Lä_ITS STABWN (n=2)	102 4			90 25	123 0	158 109		
M940_TrichophMenta_ITS2_rc STABWN (n=2)	12308 143			10401 1634	14315 1945	18802 525		
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	spezifische Signale	M939_TrichophMenta_ITS2 STABWN (n=2)	61 29	62 21	25 16	32 32		
		L946_Tphy_tonsG_ITS STABWN (n=2)	28 12	9437 841	18992 2684	845 278		
	unspezifische Signale	L947_Tphy_tonsG_ITS_rc STABWN (n=2)	12 12	29 29	0 0	223 61		
		L941_Tphy_rubG3_ITS_rc STABWN (n=2)	18971 2198	15393 4551	24785 3575	37332 2114		
		L940_Tphy_rubG3_ITS STABWN (n=2)	20 12	29 4	41 0	4 4		
		L917_RhiOryG_ITS_rc STABWN (n=2)	40724 420	29388 4445	30863 1319	53361 53		
		L916_RhiOryG_ITS STABWN (n=2)	24 8	0 0	49 24	0 0		

Spezies	spezifische Signale	Sonde	Singleplex-PCR		Multi-plex-PCR	Nested-PCR
	unspezifische Signale		Stabwn (n=2)	ITS 1+2 / ITS 3+4	ITS 1+4	
<i>Rhizopus oryzae</i>	unspezifische Signale	M828_ATerG_NoLä_ITS_rc STABWN (n=2)	1050 118	388 94	711 82	5921 1548
		M827_ATerG_NoLä_ITS STABWN (n=2)	58 8	62 4	21 21	93 4
		L881__Mu_pl+ra2_Lä_ITS_rc STABWN (n=2)	65 0	413 53	2333 1066	190 53
		L880__Mu_pl+ra2_Lä_ITS STABWN (n=2)	49 8	258 86	421 102	8 8
<i>Trichophyton tonsurans</i>	spezifische Signale	L946__Tphy_tonsG_ITS STABWN (n=2)	2198 2116	25380 7856	34429 9632	11499 732
		L947__Tphy_tonsG_ITS_rc STABWN (n=2)	4114 3305	0 0	0 0	2802 473
	unspezifische Signale	L941__Tphy_rubG3_ITS_rc STABWN (n=2)	21 4	6144 842	24609 6593	1035 129
		L940__Tphy_rubG3_ITS STABWN (n=2)	8 0	4 4	25 25	3468 615
		M940_TrichophMenta_ITS2_rc STABWN (n=2)	49 8	8125 2472	18126 4881	344 61
		M939_TrichophMenta_ITS2 STABWN (n=2)	58 8	29 29	37 12	154 113

Sondenevaluierung mit DNA von Patientenproben

Tabelle 67: Patientenproben zur Evaluierung des finalen Mikroarrays. Gelistet sind die Patientenproben Trachealsekret (TS) und Bronchoalveolarlavage (BAL), sowie die mittels mikrobiologischer Methoden identifizierten Spezies. In Klammern werden Angaben zur Menge der Pathogene innerhalb der Patientenprobe gemacht: vereinzelt (v), wenig (w), mäßig (m), Kolonien bildende Einheiten/ml (10^3 - 10^5). NAC = Nicht-*albicans* *Candida* Spezies.

#	Probe	fungale Spezies			bakterielle Spezies
		Spezies 1	Spezies 2	Spezies 3	
1	TS	<i>C. tropicalis</i> (w)			
2	BAL	<i>C. parapsilosis</i> (10^3)			
3	BAL	<i>C. albicans</i> (10^3)			Staphylokokken (10^4)
4	TS	<i>C. parapsilosis</i> (w)			<i>S. aureus</i> (m), <i>E. coli</i> (v)
5	TS	<i>C. albicans</i> (v)			<i>S. marcescens</i> (m)
6	BAL	<i>C. albicans</i> (10^3)			<i>P. aeruginosa</i> ($< 10^3$)
7	TS	<i>C. albicans</i> (w)			<i>P. aeruginosa</i> (w)
8	BAL	<i>C. albicans</i> (10^3)			
9	TS	<i>C. albicans</i> (w)			
10	TS	<i>C. albicans</i> (m)			
11	BAL	<i>C. albicans</i> (10^3)			
12	BAL	<i>C. albicans</i> ($< 10^3$)			
13	TS	<i>C. albicans</i> (v)			<i>E. coli</i> (w)
14	BAL	<i>C. albicans</i> (10^3)			
15	BAL	<i>C. albicans</i> (10^3)			<i>P. aeruginosa</i> ($< 10^3$)
16	TS	<i>C. albicans</i> (w)			<i>P. mirabilis</i> (w)
17	TS	<i>C. albicans</i> (v)			
18	BAL	<i>C. albicans</i> (10^5)			
19	TS	<i>C. albicans</i> (m)			
20	BAL	<i>C. albicans</i> ($< 10^3$)			<i>S. maltophilia</i> ($< 10^3$), <i>E. aerogenes</i> ($< 10^3$)
21	BAL	<i>C. albicans</i> (10^3)			
22	TS	<i>C. albicans</i> (v)			<i>L. rhamnosus</i> (m)
23	BAL	<i>C. albicans</i> ($< 10^3$)			
24	TS	NAC spp. (m)			<i>E. faecium</i> (m)
25	TS	NAC spp. (v)			
26	TS	NAC spp. (v)			Staphylokokken (w)
27	TS	NAC spp. (w)			<i>E. coli</i> (w)
28	TS	NAC spp. (w)			<i>E. faecalis</i> (viel)
29	TS	NAC spp. (w)			<i>E. faecalis</i> (m)
30	TS	NAC spp. (w)			<i>S. maltophilia</i> (w), Staphylokokken (m)
31	TS	NAC spp. (w)			Enterococcus spp. (w)
32	TS	NAC spp. (m)			<i>B. cepacia</i> (m)
33	TS	NAC spp. (w)			
34	TS	NAC spp. (v)			
35	TS	NAC spp. (v)			Staphylokokken (m)
36	TS	NAC spp. (m)			Enterococcus spp. (w), <i>S. epidermidis</i> (w)
37	TS	NAC spp. (w)			<i>P. aeruginosa</i> ($< 10^3$), <i>K. pneumoniae</i> (m)
38	BAL	<i>C. albicans</i> ($< 10^3$)	NAC spp. ($< 10^3$)		
39	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (m)		
40	TS	NAC spp. (w)			
41	TS	NAC spp. (w)			
42	TS	<i>C. albicans</i> (w)	<i>C. tropicalis</i> (w)		
43	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		
44	TS	NAC spp. (w)			Enterococcus spp. (w)
45	TS	<i>A. fumigatus</i> (w)	NAC spp. (v)		
46	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		<i>E. aerogenes</i> (m)
47	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		
48	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		
49	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		
50	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		
51	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		<i>S. maltophilia</i> (m)
52	TS	NAC spp. (w)			
53	BAL	<i>A. fumigatus</i> ($< 10^3$)	<i>C. albicans</i> (10^3)	NAC spp. (10^3)	

#	Probe	fungale Spezies			bakterielle Spezies
		Spezies 1	Spezies 2	Spezies 3	
54	TS	<i>C. tropicalis</i> (viel)			
55	TS	NAC spp. (m)			<i>E. coli</i> (m)
56	TS	NAC spp. (w)			
57	TS	<i>A. fumigatus</i> (v)			MRSA (v)
58	TS	NAC spp. (m)			
59	BAL	<i>C. glabrata</i> (<10 ³)			<i>E. cloacae</i> complex (10 ⁵)
60	BAL	<i>C. glabrata</i> (10 ³)			<i>E. aerogenes</i> (< 10 ³)
61	BAL	<i>C. parapsilosis</i> (<10 ³)			
62	TS	<i>A. fumigatus</i> (w)			
63	TS	<i>C. albicans</i> (w)			
64	TS	NAC spp. (w)			
65	BAL	NAC spp. (< 10 ³)			<i>S. marcescens</i> (10 ⁵), <i>P. aeruginosa</i> (10 ⁵)
66	TS	<i>C. albicans</i> (m)			
67	TS	<i>C. albicans</i> (v)			
68	TS	<i>C. albicans</i> (w)			
69	BAL	<i>C. albicans</i> (10 ³)			
70	BAL	<i>A. fumigatus</i> (10 ³)			
71	TS	<i>C. tropicalis</i> (m)			
72	TS	<i>C. albicans</i> (w)			
73	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		
74	TS	NAC spp. (w)			<i>S. maltophilia</i> (w)
75	TS	<i>A. fumigatus</i> (m)			
76	BAL	<i>A. fumigatus</i> (v), PCR positiv			
77	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (m)		
78	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		Staphylokokken (10 ⁴)
79	BAL	<i>C. albicans</i> (10 ⁴)	NAC spp. (10 ⁴)		
80	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		
81	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		Staphylokokken (m)
82	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (w)		<i>E. coli</i> (viel), <i>Enterococcus</i> spp. (v)
83	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		
84	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		Staphylokokken (10 ⁴)
85	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (w)		
86	TS	<i>C. albicans</i> (v)	NAC spp. (v)		
87	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (m)		
88	TS	<i>C. albicans</i> (w)	NAC spp. (w)		<i>K. oxytocae</i> (m)
89	TS	<i>C. albicans</i> (m)	NAC spp. (m)		
90	BAL	<i>C. albicans</i> (10 ⁴)	NAC spp. (10 ⁴)		
91	TS	<i>C. albicans</i> (w)	<i>C. glabrata</i> (m)		<i>S. aureus</i> (m)
92	TS	<i>C. albicans</i> (v)	<i>C. tropicalis</i> (m)		
93	TS	<i>C. albicans</i> (v)	<i>A. fumigatus</i> (v)		<i>M. catarrhalis</i> (m)
94	TS	NAC spp. (v)	<i>C. albicans</i> (v)		<i>S. marcescens</i> (10 ³)
95	BAL	NAC spp. (10 ³)	<i>C. albicans</i> (< 10 ³)		
96	TS	NAC spp. (m)	<i>C. tropicalis</i> (m)	<i>C. albicans</i> (v)	<i>K. pneumoniae</i> (viel), <i>E. faecium</i> (m)
97	TS	NAC spp. (w)	<i>C. albicans</i> (w)		<i>Enterococcus</i> spp. (m)
98	BAL	<i>C. albicans</i> (< 10 ³)	<i>A. fumigatus</i> (< 10 ³)	NAC spp. (< 10 ³)	
99	TS	<i>C. albicans</i> (< 10 ³)	<i>C. glabrata</i> (< 10 ³)		
100	BAL	NAC spp. (< 10 ³)			
101	TS	NAC spp. (v)			
102	TS	<i>C. tropicalis</i> (w)			Streptokokken (v)

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Hirth für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) der Universität Stuttgart c/o Fraunhofer IGB und für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Apl. Prof. Dr. Steffen Rupp möchte ich meinen Dank für die fachkundigen Gespräche und Anmerkungen sowie die direkte Betreuung gegen Ende meiner Promotion sowie für die Übernahme des Hauptberichters danken.

Bei Prof. Dr. Roland Kontermann bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Mitberichters.

Dr. Karin Lemuth spreche ich meinen Dank für die interessante Aufgabenstellung meiner Promotion und die Betreuung in der Anfangszeit meiner Arbeit aus. Dr. Ekkehard Hiller und Gabi Zelt sowie Dr. Stefan Hartmann und Dr. Simon Dally danke ich für die tolle Atmosphäre im Büro sowie im Labor. Ich werde mit Freuden an die Zeit mit euch zurückdenken.

Ich danke auch allen Kollegen der Arbeitsgruppe Infektionsbiologie und Array-Technologien sowie der Abteilung Molekulare Biotechnologie für die Hilfsbereitschaft, die mir während meiner Promotionszeit entgegengebracht wurde.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir das Biologie-Studium und letztendlich auch die Promotion ermöglicht hat. Durch euren Rückhalt und auch die finanzielle Unterstützung habt ihr mir die Möglichkeit gegeben diesen Weg zu gehen und dahin zu kommen, wo ich heute bin. Ich danke auch herzlich meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben und sich jetzt zwangsläufig auch mit Pilzen und der klinischen Diagnostik dieser auskennen. Für seine großartige Unterstützung während und für das wundervolle Leben neben der Promotion möchte ich meiner besseren Hälfte Phil danken.

Lebenslauf

Linda Sophie Luise Mayer

Geboren am 12.06.1986 in Karlsruhe

Promotion

09/2011 – 07/2015

Dissertation

„Array-basierte Identifizierung humanpathogener Schimmel- und Hefepilze für die klinische Diagnostik“

Universität Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP, Biologische Grenzflächenverfahrenstechnik c/o Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Abteilung Molekulare Biotechnologie, Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart

Studium

03/2010 - 01/2011

Diplomarbeit

„Einfluss von natürlichen und synthetischen Fungistatika auf die Ochratoxin-Biosynthese in Penicillien und Aspergillen“

Max-Rubner-Institut, 76131 Karlsruhe

10/2005-01/2011

Biologie-Studium, Schwerpunkt Molekularbiologie,
Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 76131 Karlsruhe

Schulbildung

bis 06/2005

Allgemeine Hochschulreife, Biotechnologisches Gymnasium
Bertha-von-Suttner-Schule, 76275 Ettlingen

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

Mayer, L. S. L.; Stoll, D. A.; Geisen, R.; Schmidt-Heydt, M.; Benzopyrone Coumarin Leads to an Inhibition of Ochratoxin Biosynthesis in Representatives of *Aspergillus* and *Penicillium* spp. via a Type of Feedback Response Mechanism. Journal of Food Protection, Number 4, April 2014, pp. 528-690, pp. 647-652(6)

Mayer, L. S. L., Hartmann S. C., Lemuth K., Cavalari M., Weile J., Bailer S. M., Rupp S.; DNA microarray for identification of human pathogenic fungi in respiratory secretion via semi nested-PCR. Publikation in Vorbereitung

Wissenschaftliche Tagungsvorträge

Mayer, L. S. L., Hartmann, S. C., Boven, K.-H., Cavalari, M., Rothacher, P., Weile, J., Bailer, S. M., Rupp S.; Identification of human pathogenic moulds and yeasts via Lab-on-a-chip system. 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., September/Oktober 2012, Congress Center Hamburg (CCH)

Mayer, L. S. L., Hartmann, S., Cavalari, M., Weile, J., Rothacher, P., Boven, K.-H., Lemuth, K., Bailer, S. M., Rupp, S.; Identification of human pathogenic moulds and yeasts via Lab-on-a-chip system. Statusworkshop FG Eukaryotische Pathogene, Februar 2013, Hannover Medical School

Mayer, L. S. L., Hartmann, S., Cavalari, M., Weile, J., Rothacher, P., Boven, K.-H., Lemuth, K., Bailer, S. M., Rupp, S.; Microarray analysis as part of a Lab-on-a-chip system to identify human pathogenic fungi. 47. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., September 2013, Theologicum Tübingen

Mayer, L. S. L., Hartmann, S., Cavalari, M., Weile, J., Rothacher, P., Boven, K.-H., Lemuth, K., Bailer, S. M., Rupp, S.; Identification of human pathogenic fungi via DNA-microarray analysis for clinical applications. Statusworkshop FG Eukaryotische Krankheitserreger, Februar 2014, Göttingen

Mayer, L. S. L., Hartmann, S., Cavalari, M., Weile, J., Rothacher, P., Boven, K.-H., Lemuth, K., Bailer, S. M., Rupp, S.; Identification of human pathogenic fungi via DNA-Microarray analysis for clinical applications. 48. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., September 2014, Salzburg

Posterpräsentationen

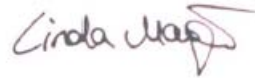
Mayer, L. S. L., Hartmann, S., Cavalari, M., Weile, J., Rothacher, P., Boven, K.-H., Lemuth, K., Bailer, S. M., Rupp, S.; Microarray analysis as part of a Lab-on-a-chip system to identify human pathogenic fungi. Human Fungal Pathogens, La Colle sur Loup, Mai 2013, La Colle sur Loup, Nizza, Frankreich

Mayer, L. S. L., Hartmann, S., Cavalari, M., Weile, J., Rothacher, P., Boven, K.-H., Lemuth, K., Bailer, S. M., Rupp, S.; Identification of human pathogenic fungi via DNA-Microarray analysis for clinical applications. 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V. in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie (DGI) e.V., September 2013, Rostock

Mayer, L. S. L., Hartmann, S., Cavalari, M., Weile, J., Rothacher, P., Boven, K.-H., Lemuth, K., Bailer, S. M., Rupp, S.; Identification of human pathogenic moulds and yeasts via microarray analysis in a Lab-on-a-chip system. 4. Gemeinsamer Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V. zusammen mit der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) e. V., Oktober 2014, Dresden

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Linda S. L. Mayer". The signature is written in a cursive style with a prominent flourish at the end.

Stuttgart, August 2015

Linda S. L. Mayer