

**Teil I – Kurzbericht: FINAR2.0 TV3 - ZB1 03ZZ0834C**

**Zwanzig20** InfectControl 2020 – Verbundvorhaben FINAR2.0: Management von Pilzinfektionen bei zunehmender Azolresistenz

**Teilprojekt TV3:** Multiplex-RT-PCR zum Nachweis pilzlicher Sepsiserreger aus Vollblut

Zuwendungsgeber:	Bundesministerium für Bildung und Forschung
Förderkennzeichen:	03ZZ0834C
Projektlaufzeit:	01. April 2019 bis 30. September 2022 (nach genehmigter kostenneutraler Verlängerung)
Berichtslaufzeit:	01. April 2019 bis 30. September 2022

**Die Verantwortung für den Inhalt der Veröffentlichung liegt beim Autor.**

Dresden, 10.03.2023

Berichtspflichtiger: Biotype GmbH, Moritzburger Weg 67, 01109 Dresden

Projektleitung: Dr. Werner Brabetz

## Zusammenfassung der ursprünglichen Aufgabenstellung

Im Arbeitsschwerpunkt FINAR2.0-TV3-AS4 des Teilvorhabens sollte ein Test zur gruppen- und gattungsspezifischer Genotypisierung klinisch relevanter invasiver Mykoseerreger entwickelt werden. Um die Sensitivität zu steigern, sollte der Test aus einer Einschnitt-Multiplex-RT-PCR bestehen, um sowohl DNA als auch RNA amplifizieren zu können. Für das Untersuchungsgut Vollblut sollte ein Extraktionsprotokoll für TNA (Total Nucleic Acid) etabliert werden.

Im Arbeitsschwerpunkt FINAR2.0-TV3-AS5 des Teilvorhabens sollte der entwickelte Laborprototyp in mindestens 5 klinisch-mikrobiologischen Laboren geprüft und auf seine Gebrauchstauglichkeit getestet werden.

## Überblick über den wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde

Das Projekt stellte eine Weiterführung des Projektes FINAR TV4 (Förderbescheid Nr. 03ZZ0809D) des Verbundprojektes Zwanzig20 InfectControl 2020 FINAR dar, welches vom 1. Dezember 2015 bis 31. März 2019 durchgeführt wurde. Der Abschlussbericht dieses vorausgegangenen Projektes und die Vorhabensbeschreibung des Folgeverbundprojektes Zwanzig20 InfectControl 2020 FINAR 2.0 beinhalten ausführliche Beschreibungen des wissenschaftlichen und technischen Standes, an den angeknüpft wurde.

Bei einer Sepsis reicht bereits eine geringe Erregeranzahl aus, um eine überschießende Immunantwort des betroffenen Patienten mit lebensbedrohlichen Folgen auszulösen. Bakterien stellen dabei mit mehr als 90 % den Hauptanteil, während Pilze mit ca. 1 bis 8 % besonders schwere Krankheitsverläufe mit hoher Morbidität und Sterblichkeit verursachen. Viren und Parasiten sind bei Septikämien nur in geringem Umfang beteiligt. Ein möglichst frühzeitiger differentieller Erregernachweis ist für die Einleitung einer wirksamen Therapie (Antibiotika, Antimykotika oder Virostatika) besonders entscheidend. Um dies für einen molekulargenetischen Nachweis des Erregers aus peripherem venösem Vollblut zu leisten muss durch die Präanalytik sichergestellt werden, dass die geringen Nukleinsäuremengen aus den Erregern nicht aufgrund des TNA-Überschusses an humanen Blutzellen verlorengehen. In der Literatur waren dazu beim Projektbeginn mehrere Strategien beschrieben (Referenzen siehe Antrag). Zum einen kann eine vorgeschaltete Anreicherung des Erregermaterials wie beispielsweise durch immunchromatografische Verfahren erfolgen. Andererseits können in einem vorgeschalteten Schritt humane Zellen selektiv lysiert werden. Nach einem enzymatischen Abbau der freigesetzten TNA können schließlich die nicht lysierten Erregerzellen mittels Zentrifugation, Filtration oder den Einsatz membranselektiven Chemikalien angereichert werden. Patentschriften wie US6605439B2, US8481265B2, US9328326B2 und WO2012168003A1 beschreiben entsprechende Lyseprotokolle. Das kommerzielle MolYsis® Kit (EP1861495B1, Molyzm GmbH, Bremen, DE) kombiniert schließlich eine selektive Lyse humaner Zellen mit Detergens und chaotroper Chemikalien mit einer gleichzeitigen DNase-Behandlung und anschließender Anreicherung der unlysierten Erregerzellen.

Eine weitere Strategie besteht in der Nutzung von RNA als Zielmolekül. Dabei sind vor allem rDNA-Operons in multiplen Kopienzahlen und hohen Transkriptionsraten ( $10^3$  bis  $10^4$ ) pro Zelle von Vorteil. Bei *Aspergillus fumigatus* haben z. B. Herrera *et al.* (J Clin Microbiol 47: 1325-32, 2009) 38 bis 91 Kopien pro Zelle der 18s-rDNA in Abhängigkeit des geografischen Isolates bestimmt. Um RNA bzw. TNA als Template nutzen zu können, muss zuerst eine Umschreibung der RNA in DNA (RT - reverse transkription) erfolgen. Dies kann entweder mittels eines kommerziellen Einschnitt-RT-PCR-Mixes

geschehen oder durch den Einsatz einer Mutante der *Taq* DNA Polymerase der Firma myPOLS Biotec GmbH (Konstanz, DE), die beide Reaktionsschritte durchführen kann.

## Ablauf des Vorhabens

Die Durchführung der Teilvorhaben FINAR2.0-TV3-AS4 und FINAR2.0-TV3-AS5 war von April 2019 bis Dezember 2021 geplant. Im März 2020 wurde die weltweite Ausbreitung COVID-19 von der WHO zu einer Pandemie erklärt. Um einen Beitrag zur Bekämpfung und Eindämmung der Krankheit zu leisten, verschoben sich die firmeninternen Prioritäten. Innerhalb kürzester Zeit wurden bei der Biotype GmbH die Prozesse für eine umfangreiche Produktion von Kitkomponenten für einen PCR-Test zum Nachweis von SARS-CoV-2-Viren etabliert. Darüber hinaus waren Anpassungen der betriebsinternen Hygienepläne mit eingeschränkten Raumnutzungen und Schichtbetrieb notwendig. Die daraus entstandenen Verzögerungen betrafen jedes Arbeitspaket, da für das Projekt wichtige Räumlichkeiten und Personal über mehrere Monate nicht zur Verfügung standen. Eine kostenneutrale Verlängerung bis September 2022 wurde beantragt und bewilligt.

## Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Es wurden künstliche Templates (RNA und DNA) mit ausgewählten Gensequenzen von *Candida albicans* und *A. fumigatus* hergestellt. Mit diesen konnten zwei kommerziell erhältliche Einschritt-RT-qPCR-Mixe evaluiert werden und Erkenntnisse in Bezug auf die Verwendung von DNA, RNA und TNA als Ausgangsmaterial gewonnen und damit die Mono- und MultiplexPCR während der Labormusterentwicklung durchgeführt werden.

Für die Entwicklung des Extraktionsprotokolls für Nucleinsäuren wurden Vollblutproben (Blutspendedienst DRK Dresden) mit einer definierten Anzahl lebensfähiger Zellen bestimmter Erreger versetzt und anschließend prozessiert. Aufgrund der pandemischen Situation waren jedoch ab März 2020 keine Arbeiten mit Organismen der Risikoklasse 2 möglich. Als Ersatz für *Candida* konnte *S. cerevisiae* genutzt werden, eine Etablierung von *A. oryzae* als Modellerreger schlug allerdings fehl. Diese Umstellung konnte authentische Sepsisproben nur bedingt abbilden. Das abschließende Extraktionsprotokoll bestand aus einer neuen, patentrechtlich freien, selektiven chemisch-enzymatischen Lyse der humanen Zellen mit einer anschließenden Extraktion der Nucleinsäuren aus intakten Erregerzellen mittels mechanischer Lyse und Säulenteknologie. Eine Verifizierungsstudie beim Kooperationspartner FINAR-TV1 mit verschiedenen infektiösen Erregern (*C. kefyr*, *C. albicans*, *Penicillium spp.* und *A. fumigatus*) erbrachte jedoch weiteren Optimierungsbedarf in Bezug auf die Handhabung und die Ausbeuten.

Das optimierte Labormuster, welches auf einer Einschritt-RT-Multiplex-qPCR mit Hydrolysesonden basierte und somit den Qualitätskriterien der aktuellen RiliBÄK-B3-2019 entsprach, umfasste die Biomarker Panfungal, *Candida spp.*, *Asperillus spp.* und Interne Positivkontrolle). Im Verifizierungsschritt wurden LOB (Limit of Blank), LOD (Limit of Detection) und Spezifität (bakterielle und fungale Erreger) bestimmt. Zusätzlich wurden Mischproben unterschiedlicher Verhältnisse von *Candida*- und *Aspergillus*-Proben getestet. Alle Versuche erfolgten mit einem Hintergrund von mindestens 50 ng humaner DNA pro Reaktion. Diese Ergebnisse konnten jedoch vom Kooperationspartner FINAR-TV1 in der monozentrischen Phase des Ringversuches nicht reproduziert werden. Eine Nachmessung der extrahierten Ringversuchsproben bei der Biotype GmbH bestätigte jedoch weitgehend die Ergebnisse aus der Verifizierung. Die Einschritt-RT-Multiplex-qPCR erbrachte jedoch starke Schwankungen. Weitere Optimierungen waren jedoch im Rahmen des Projektzeitraums nicht mehr möglich, sodass der abschließende multizentrische Ringversuch nicht durchgeführt werden konnte.

## **Teil II – Eingehende Darstellung: FINAR2.0 TV3 - ZB1 03ZZ0834C**

**Zwanzig20** InfectControl 2020 – Verbundvorhaben FINAR2.0: Management von Pilzinfektionen bei zunehmender Azolresistenz

**Teilprojekt TV3:** Multiplex-RT-PCR zum Nachweis pilzlicher Sepsiserreger aus Vollblut

Zuwendungsgeber:	Bundesministerium für Bildung und Forschung
Förderkennzeichen:	03ZZ0834C
Projektlaufzeit:	01. April 2019 bis 30. September 2022 (nach kostenneutraler Verlängerung)
Berichtslaufzeit:	01. April 2019 bis 30. September 2022

**Die Verantwortung für den Inhalt der Veröffentlichung liegt beim Autor.**

Dresden, 10.03.2023

Berichtspflichtiger: Biotype GmbH, Moritzburger Weg 67, 01109 Dresden

Projektleitung: Dr. Werner Brabetz

## Durchgeführte Arbeiten im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung

### 1) FINAR-TV3-AS4-AP1: Präanalytik und Extraktion von Nukleinsäuren

#### Ziel laut Vorhabensbeschreibung

Es sollte ein robustes Protokoll für die Präanalytik und die Aufreinigung von Nukleinsäuren der Arbeitsschwerpunkte AS4 (Optimierung eines Laborprototypes zur molekularen Differentialdiagnostik invasiver Mykoseerreger) und AS5 (Gebrauchstauglichkeitsprüfung des optimierten Laborprototypes in einem Labornetzwerk im Rahmen einer mono- und multizentrischen Testung in Zusammenarbeit mit dem klinischen Partner FINAR-TV1) erarbeitet werden.

#### Ergebnisse

Es wurde überprüft, ob die in der Literatur beschriebenen Protokolle bereits mit fungalen Erreger getestet bzw. auf fungale Erreger übertragen werden konnten.

Aus den im Antrag bereits dargestellten Recherchen wurden insbesondere Strategien basierend auf der selektiven Lyse der Blutzellen und anschließender Anreicherung der Keime mittels Zentrifugation oder Filtration, wie in den Patentschriften US6605439B2 (Osmolyse plus Enzyme), US8481265B2 (Saponin), US9328326B2 (chaotrophe Chemikalie und Detergens) und WO2012168003A1 (alkalische Lyse und Detergens) dargestellt, gesetzt. EP1861495B1 (kommerzielles MolYsis® Kit, Molyzm GmbH, Bremen, DE) kombiniert schließlich eine selektive Lyse humaner Zellen mit Detergens und chaotropher Chemikalie mit einer gleichzeitigen DNase-Behandlung und anschließender Anreicherung der unlysierten Erregerzellen. Bei gültigen Patenten wurde möglichst auf die Prüfung von Umgehungsformen geachtet. Zhou und Pollard (BMC Infect Dis 12: 164, 2012) erzielten ferner eine 1000fache Anreicherung von Bakterienzellen (Modellorganismus *Salmonella typhi*) durch selektive Lyse von Leukozyten mit 9%iger Ochsen-galle und spezifischer DNase-Behandlung. Dieses Verfahren sollte mit Pilzzellen geprüft werden. Es wurde jedoch vermutet, dass sich Ochsen-galle als Naturprodukt für die Erstellung robuster und wirtschaftlich verwertbarer Diagnostika schlecht standardisieren lässt.

Zwar lassen sich entsprechende selektive Lyseverfahren auch automatisieren (siehe das kommerziell erhältliche Produkt MolYsis®), doch bedingen zusätzliche Verfahrensschritte einen Zeit- und Sensitivitätsverlust, sowie eine erhöhte Gefahr einer Kreuzkontamination. Deshalb war ein weiteres Ziel, die Anzahl der Verfahrensschritte und den gesamten Zeitbedarf des Protokolls möglichst zu reduzieren.

Die für die einzelnen Methoden benötigten Materialien (Chemikalien, Enzyme und Extraktionskits) wurden recherchiert und wenn möglich von mehreren Herstellern angefordert.

Die in der Literatur und Patentschriften beschriebenen Lyse- und Extraktionsprotokolle konnten nur im geringen Umfang reproduziert werden. Eine Trennung von intakten humanen und Erregerzellen mittels differentieller Zentrifugation oder Filtration schlug fehl. Die selektive Lyse mittels Ochsen-galle (Zhou und Pollard, 2012) scheiterte, wie bereits vermutet, an der großen Varianz der Ergebnisse bei der Verwendung verschiedener Produkte und Chargen der Naturstoffpräparate, wodurch eine Standardisierung nicht möglich war.

Die besten Ergebnisse wurden schließlich mit einem mehrstufigen Protokoll erzielt. Erythrozyten wurden im ersten Schritt lysiert. Danach erfolgte der Aufschluss der Leukozyten und die gleichzeitige Hydrolyse der freigesetzten humanen Nukleinsäuren mit einer Lipase und Nuklease in einer optimierten Lysepuffer-Formulierung (Details des Verfahrens werden als Betriebsgeheimnis eingestuft).

Danach wurden die intakten Erregerzellen pelletiert und aus diesen mit einem kommerziell erhältlichen Kit Testproben-DNA dargestellt. Für diesen Schritt wurden die Produkte mehrerer Hersteller getestet. Dabei konnte nur mit dem AllPrep Fungal DNA/RNA/Protein Kit von Qiagen GmbH (Hilden, DE) ein Gemisch aus DNA und RNA (TNA – Total Nucleic Acid) isoliert werden. Das EchoLUTION Plant DNA Kit von BioEcho Life Sciences GmbH (Köln, DE) und das Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit von Zymo Research Europe GmbH (Freiburg, DE) sind nur für die Extraktion von DNA ausgelegt. Das Quick-RNA Fungal/Bacterial Microprep Kit von Zymo Research Europe GmbH (Freiburg, DE) ist wiederum nur für die Extraktion von RNA gedacht. Die Protokolle der Hersteller wurden ggf. an die speziellen Anforderungen des Probenmaterials angepasst. Als Vergleichsstandard wurde das MoLYsis® Complete5 Kit der Firma Molzym GmbH & Co. KG (Bremen, DE) nach Herstellerangaben mitgeführt. Sowohl die Konzentrationen der isolierten fungalen Nukleinsäuren als auch der humane Hintergrund wurden separat in jeweils neu etablierten Singleplex Einschritt-RT-qPCRs und mitgeführten Standardreihen ermittelt.

In den Versuchen wurden die besten Ergebnisse mit dem EchoLUTION Plant DNA Kit und dem MoLYsis® Complete5 Kit erzielt. Hier konnten jeweils zehn *Saccharomyces cerevisiae* Zellen in 3 ml Vollblut sicher nachgewiesen werden. Die anderen Protokolle schwankten sehr stark bzw. waren nicht sensitiv genug.

### Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung

In der ursprünglichen Vorhabensbeschreibung waren als Modellerreger *A. fumigatus* und *C. albicans* eingeplant. Aufgrund der SARS-CoV2-pandemiebedingten Umstände war jedoch ein Arbeiten mit Erregern der Risikoklasse 2 ab März 2020 nicht mehr möglich. Deshalb wurden die Experimente mit *S. cerevisiae*, einem Organismus der Risikoklasse 1, durchgeführt.

Aufgrund dessen müssen die folgenden Punkte bei den Ergebnissen beachtet werden:

- 1) Bei dem Modellerreger *S. cerevisiae* handelt es sich vergleichbar mit *Candida spp.* um eine Hefe, deren Lyse im Vergleich zu Erregern der Gattung *Aspergillus spp.* aufgrund unterschiedlicher Zellwandzusammensetzung erfahrungsgemäß einfacher ist. Vergangene Projekte in der Biotype haben bereits gezeigt, dass bei letzteren Erregern eine mechanische Lyse essenziell ist, die im Protokoll des MoLYsis® Complete5 Kits der Firma Molzym GmbH & Co. KG (Bremen, DE) jedoch nicht enthalten ist.
- 2) Die zur Quantifizierung verwendete Gensequenz liegt im Modellerreger *S. cerevisiae* in multiplen Kopien vor und wird besonders stark exprimiert (Starterkulturen in der Lebensmittelindustrie), wodurch es zu einer entsprechend starken RT-PCR-Amplifikation kommt. Für vergleichende Experimente und Optimierungen der Protokolle war dieser Modelorganismus durchaus geeignet. Es konnte jedoch keine gesicherte quantitative Aussage getroffen werden, wie effektiv andere Erreger, bei denen die Gensequenz schwächer exprimiert wird, nachgewiesen werden können. Die Aussagekraft der Ergebnisse im Bereich der Nachweisgrenze (LOD - Limit of Detection) und ihre Übertragbarkeit auf klinisches Untersuchungsgut muss deshalb kritisch bewertet werden.

## **2) FINAR-TV3-AS4-AP2: Herstellung von Referenzproben**

### **Ziel laut Vorhabensbeschreibung**

Es sollten artifizielle Ziel-Nukleinsäuren (RNA und DNA) aus Referenzpilzstämmen hergestellt werden. Für die Extraktionsversuche sollte Vollblut mit einer standardisierten Zellsuspension versetzt werden.

### **Ergebnisse**

Vorrangig wurde in der PCR mit artifiziellen DNA- und RNA-Matrizen (Templates) der Referenzstämme *C. albicans* und *A. fumigatus* gearbeitet. Entsprechende Plasmide mit Transkriptionssignalen lassen sich synthetisch darstellen und können von spezialisierten Firmenkundenspezifisch bezogen werden. Für die Darstellung der PCR-Amplifikate, die In-vitro-Transkription und die verschiedenen Aufreinigungsschritte wurden die folgenden Kits von New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M., DE) eingesetzt: Q5 High-Fidelity PCR Kit, Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg), HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit und Monarch RNA Cleanup Kit (500 µg).

Zusätzlich wurden die genomischen DNAs verschiedener pilzlicher und bakterieller Organismen aus dem internen Bestand der Biotype GmbH (Dresden, DE) verwendet. Die Sammlung umfasst u.a. mehrere Arten der Gattungen *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Candida spp.* und weitere septikämiespezifischer Organismen.

Bei den Arbeiten mit RNA musste vor allem darauf geachtet werden, dass sich keine DNA-Reste in den entsprechenden Testproben befanden, die die Ergebnisse verfälschen konnten. Eine DNase-Behandlung war in diesen Fällen deshalb essenziell.

Zur Testung der verschiedenen Extraktionsstrategien wurde mit Vollblut (Blutspendedienst DRK Dresden) und *S. cerevisiae* Flüssigkulturen gearbeitet. Die vorliegenden Hefesuspensionen wurden mittels Zellkammer und Lichtmikroskop ausgezählt und in definierter Menge in die Blutproben gegeben.

### **Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung**

Die artifiziellen Templates wurden wie in der Vorhabensbeschreibung vorgesehen aus genomischer DNA der beiden Haupterreger *C. albicans* und *A. fumigatus* hergestellt. Der Umgang mit den Lebendkulturen dieser Erreger war aufgrund SARS-CoV2-pandemiebedingter Umstände ab März 2020 nicht mehr möglich. Als Ersatzmodell für *Candida spp.* mit hefeartiger Zellwand und entsprechenden Wachstum wurde auf den Organismus *S. cerevisiae* (Bier- und Bäckerhefe) der Risikogruppe 1 zurückgegriffen. Eine Etablierung des Organismus *A. oryzae* als Ersatzmodell für die Schimmelpilze war nicht erfolgreich, da keine geeignete Sporensuspension zur Bestimmung der cfu (colony forming units) hergestellt werden konnte.

## **3) FINAR-TV3-AS4-AP3: Etablierung einer Einschnitt-RT-PCR und Vergleich zur PCR im Monoplex**

### **Ziel laut Vorhabensbeschreibung**

Es sollten die Reaktionsbedingungen für eine Einschnitt-RT-PCR im Monoplex etabliert und optimiert werden.

## Ergebnisse

Im ersten Schritt wurden unterschiedliche Einschritt-RT-qPCR Kits von verschiedenen Herstellern recherchiert, angefordert und getestet. Die Testungen beinhalteten Sensitivitätstestungen mit artifiziellen DNA- und RNA-Matrizen. Außerdem wurden mittels geeigneter Testungen die Hotstart-Funktion aller drei wichtigen Enzym-Domänen (DNA-Polymerase, Nuklease und Reverse Transkriptase) untersucht.

Der CAPITAL™ qRT-PCR Probe Mix der biotechrabbit GmbH (Berlin, DE) lieferte schließlich mit den artifiziellen Nukleinsäuren die besten Ergebnisse. Allerdings stellte sich bei späteren Testungen heraus, dass produktionsbedingt bereits eine geringe Menge an pilzlichem Material im Mix des Herstellers vorliegt. Diese Konzentration erwies sich als chargenabhängig.

Als Alternative wurde der Low LOD 1-Step RT-qPCR Mix von Meridian Life Science (Luckenwalde, DE) identifiziert.

## Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung

Wie in der ursprünglichen Vorhabensbeschreibung beschrieben, wurden zwei Einschritt-RT-qPCR Mixe etabliert. Der Low LOD 1-Step RT-qPCR Mix von Meridian Life Science (Luckenwalde, DE) enthält keine fungale Nukleinsäure aus dem Produktionsprozess des Herstellers und wurde deshalb für die weiteren Arbeitspakete verwendet. Der CAPITAL™ qRT-PCR Probe Mix der biotechrabbit GmbH (Berlin, DE) lieferte ebenfalls gute Ergebnisse und sollte in zukünftigen Projekten ohne fungalen oder bakteriellen Hintergrund in Betracht gezogen werden.

### **4) FINAR-TV3-AS4-AP4: Vergleich von PCR und Einschritt-RT-PCR anhand von Nukleinsäuren aus vitalen Pilzen**

#### **Ziel laut Vorhabensbeschreibung**

Es sollen die Sensitivitäten von qPCR und Einschritt-RT-qPCR verglichen werden.

#### **Ergebnisse**

Mittels definierten DNA-RNA-Gemischen wurde der Einfluss von RNA auf die Gesamtperformance einer RT-qPCR untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Amplifikation bei einem gleichzeitigen Einsatz von DNA und RNA verbessert werden kann.

Allerdings müssen ein paar wesentliche Punkte berücksichtigt werden:

- 1) Im Projekt konnte nur mit dem AllPrep Fungal DNA/RNA/Protein Kit von Qiagen GmbH. (Hilden, DE) eine gleichzeitige Extraktion von DNA und RNA durchgeführt werden. Im Vergleich mit anderen Extraktionskit konnte die Performance jedoch nicht überzeugen.
- 2) Anders als DNA liegt RNA nicht in einer konstanten Menge in den Zellen vor. Je nachdem, ob sie sich in einer Wachstums- und Produktionsphase oder einer Ruhephase befinden, variiert die RNA-Konzentration erheblich.

#### **Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung**

Wie in der ursprünglichen Vorhabensbeschreibung beschrieben, wurde der Einfluss von einem RNA-DNA-Mix als Template untersucht. Leider konnten mögliche positive Effekte aufgrund der Defizite bei dem Extraktionsprotokoll nicht genutzt werden.

## **5) FINAR-TV3-AS4-AP5: Testung aller PCR-Monoplexe des Testprototyps aus FINAR als Einschritt-RT-PCR**

### **Ziel laut Vorhabensbeschreibung**

Es sollten die erregerspezifischen Oligonukleotide (Primerpaare und Sonden) des Testprototyps aus dem vorausgegangenen FuE-Vorhaben FINAR getestet und als Einschritt-RT-qPCR Reaktion etabliert werden.

### **Ergebnisse**

Es zeigte sich, dass sich die Oligonukleotide des Testprototyps aus FINAR nicht für weiterführende Testungen geeignet haben. Insbesondere sollte eine Kreuzreaktivität pathogener *Aspergillus*-Arten mit *Penicillium spp.* ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde ein Neudesign durchgeführt.

Die Sequenzrecherche wurde auf der Internetseite der National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchgeführt und qualitativ kuratierte Sequenzen der benötigten Organismen heruntergeladen. Des Weiteren wurden Sequenzdaten des Kooperationspartners FINAR2.0-TV1 am Nationalen Referenzzentrum für invasive Pilzinfektionen (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg, DE) genutzt. Der Fokus lag vor allem auf Multicopy-Genen, die zudem auch noch nach dem Splicing der Prä-RNA vorhanden waren (z. B. rDNA-Gencluster).

Für das Alignment und das anschließende Oligo-Design wurde die Software Geneious® (Dotmatics Inc., Boston, US-MA) verwendet. Es wurden für die folgenden Analyseparameter Primer und TaqMan™-Sonden entworfen: Pan-fungal (PAN), *Aspergillus spp.* (ASP) und *Candida spp.* (CAN). Eine zusätzliche interne PCR-Positivkontrolle (Quality Sensor gemäß MiQ/RiliBÄK - Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen) wurde etabliert. Dieser soll anzeigen, dass die Einschritt-RT-qPCR nicht durch Inhibitoren gestört wird.

Die Testungen der Primer und Sonden erfolgte mit den artifiziellen Nukleinsäurematrizen von *A. fumigatus* und *C. albicans*. Es konnten mehrere Primer- und Sonden-Kombinationen für die weiterführenden Multiplex-Testungen identifiziert werden.

### **Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung**

Die ursprünglichen Oligonukleotide des Prototyps aus FINAR wurden nicht verwendet, sondern ein Neudesign durchgeführt und erfolgreich abgeschlossen.

## **6) FINAR-TV3-AS4-AP6: Multiplex-RT-PCR Testprototyp und dessen Verifizierung**

### **Ziel laut Vorhabensbeschreibung**

Für die anschließenden mono- und multizentrischen Gebrauchstauglichkeitsprüfungen sollte ein verifizierter Multiplex-Einschritt-RT-qPCR-Testprototyp als herstellungsnaher Charge vorliegen.

### **Ergebnisse**

Die einzelnen Monoplexe wurden in einem Multiplex optimiert (Oligokonzentrationen, Verteilung der Targets auf die einzelnen Kanäle des qPCR-Cyclers, Puffersystem etc.) und anschließend verifiziert. Während der Verifizierung wurden die folgenden Parameter bestimmt: LOB (Limit of Blank), LOD

(Limit of Detection) und Spezifität. Zusätzlich wurden noch ein Versuch mit geeigneten Mischproben (unterschiedliche Verhältnisse von *Candida-Aspergillus*-Templates) durchgeführt. Alle Versuche erfolgten mit einem Background von mindestens 50 ng humaner DNA pro Reaktion.

In der Verifizierung wurden die folgenden Sensitivitäten ermittelt:

- LOD für pan-fungal = 50 Kopien pro Reaktion
- LOD für *Candida spp.* = 50 Kopien pro Reaktion
- LOD für *Aspergillus spp.* = 25 Kopien pro Reaktion

In der Verifizierung wurden die folgenden Spezifitäten nachgewiesen:

Tabelle 1: Übersicht der in der Verifizierung nachgewiesenen Spezifität.

Organismus	Pan-fungal	<i>Candida spp.</i>	<i>Aspergillus spp.</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	nachgewiesen	-	nachgewiesen
<i>Aspergillus flavus</i>	nachgewiesen	-	nachgewiesen
<i>Aspergillus niger</i>	nachgewiesen	-	nachgewiesen
<i>Aspergillus versicolor</i>	nachgewiesen	-	nachgewiesen
<i>Fusarium solani</i>	nachgewiesen	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	nachgewiesen	-	-
<i>Talaromyces marneffeii</i>	nachgewiesen	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i> *	nachgewiesen	-	nachgewiesen
<i>Penicillium rubens</i> *	nachgewiesen	-	nachgewiesen
<i>Candida albicans</i>	nachgewiesen	nachgewiesen	-
<i>Candida glabrata</i>	nachgewiesen	nachgewiesen	-
<i>Candida tropicalis</i>	nachgewiesen	nachgewiesen	-
<i>Candida parapsilosis</i>	nachgewiesen	nachgewiesen	-
<i>Candida krusei</i>	nachgewiesen	nachgewiesen	-
<i>Candida guilliermondii</i>	nachgewiesen	nachgewiesen	-

\*Die Unspezifität wurde mit dem Kooperationspartner FINAR2.0-TV1 (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg, DE) besprochen und als akzeptabel eingestuft.

Die nachfolgenden Organismen wurden während der Entwicklung mittels Sequenzanalyse betrachtet:

*Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus tubingensis*, *Penicillium chrysogenum*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Lichtheimia corymbifera*, *Lichtheimia ramosa*, *Mucor circinelloides*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microspores*, *Rhizomucor pusillus*, *Saksenaea vasiformis*, *Basidiobolus ranarum*, *Conidiobolus coronatus*, *Candida auris*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae*, *Candida famata*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*

Der Aufbau und Umfang der einzelnen Verifizierungsexperimente orientierten sich an:

- Broeders S, Huber I, Grohmann L, et al. (2014): Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods 37: 115–126. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.03.008.
- Delobel C, Foti N, Savini C, et al. (2009): Report on the Verification of the Performance of a Construct-Specific Assay for the Detection of Flax CDC Triffid Event FP967 Using Real-Time PCR. EUR 24154 EN. Luxembourg (Luxembourg). Publications Office of the European Union; 2009. JRC56587. Download von URL <https://core.ac.uk/download/pdf/38620040.pdf> am 2018-08-24.

- Pierson-Perry JF, Vaks, JE, Durham AP et al. (2012): EP17A2E - Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline - second edition. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, US-PA, ISBN 1-56238-796-0 (electronic).

### **Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung**

Der Testprototyp wurde erfolgreich verifiziert und für weitere monozentrische Testungen beim Kooperationspartner FINAR2.0-TV1 (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg, DE) vorbereitet.

### **7) FINAR2.0-TV3-AS5-AP1: Vorbereitung der Ringversuchsproben und Kits**

#### **Ziel laut Vorhabensbeschreibung**

Die Proben und das Labortestbesteck für den Ringversuch sollten bereitgestellt werden.

#### **Ergebnisse**

Da keine Arbeiten mit Organismen der Risikoklasse 2 in den Laboren der Biotype möglich waren, wurde in Absprache mit dem Kooperationspartner FINAR2.0-TV1 (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg, DE) beschlossen, dass die Ringversuchsproben vor Ort beim Kooperationspartner hergestellt werden. Als Probenmaterial sollte Vollblut mit einer definierten Anzahl an Hefezellen bzw. Konidien versetzt und anschließend nach dem Protokoll der Biotype extrahiert werden. Der Einsatz von Patientenproben war nicht vorgesehen.

Da die multizentrische Phase des Ringversuches nicht stattfand, entfiel die konkrete Planung, wie die anderen Referenzlabore mit den Ringversuchsproben ausgestattet werden. Eine Herstellung vor Ort schien jedoch auch in dieser Phase im Bereich des Möglichen zu liegen.

### **Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung**

Die Biotype stellte alle benötigten Reagenzien für die Extraktion und die anschließende Einschnitt-RT-qPCR zur Verfügung. Die Herstellung der Ringversuchsproben lag in der Verantwortung des Kooperationspartners FINAR2.0-TV1.

Die multizentrische Phase des Ringversuches fand aufgrund der Ergebnisse der monozentrischen Vortestungen (siehe Kapitel 10) nicht statt, wodurch eine konkrete Planung der labortechnischen und logistischen Begebenheiten entfiel.

### **8) FINAR2.0-TV3-AS5-AP2: Erstellung einer Gebrauchsanleitung und eines Erhebungsbogens**

#### **Ziel laut Vorhabensbeschreibung**

Es sollten eine Gebrauchsanweisung und ein Erhebungsbogen für den Ringversuch erarbeitet werden.

## Ergebnisse

Es wurde eine Gebrauchsanweisung auf Englisch erstellt und dem Kooperationspartner FINAR2.0-TV1 zur Verfügung gestellt. Die Arbeiten im Labor konnten anhand der enthaltenen Protokolle durchgeführt werden.

Der Erhebungsbogen sollte erst in der multizentrischen Phase des Ringversuches zum Einsatz kommen.

## Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung

Die Gebrauchsanweisung wurde erstellt und konnte genutzt werden. Der Erhebungsbogen kam nicht zum Einsatz, da die multizentrische Phase nicht stattfand (siehe Kapitel 10).

### **9) FINAR2.0-TV3-AS5-AP3: Versand der Ringversuchsproben und -kits**

#### **Ziel laut Vorhabensbeschreibung**

Der Versand der Ringversuchsproben und -kits sollte durchgeführt werden.

#### **Ergebnisse**

Die Reagenzien und Kits für die Extraktion und die anschließende Einschnitt-RT-qPCR wurden eingekauft bzw. hergestellt und dem Kooperationspartner FINAR2.0-TV1 in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt.

Die Ringversuchsproben wurden vom Kooperationspartner FINAR2.0-TV1 hergestellt. Es folgt eine Auflistung der verwendeten Organismen und die Konzentrationen pro 3 ml Vollblut:

- *Candida kefyr* → 300 cfu / 30 cfu / 3 cfu
- *Candida albicans* → 300 cfu / 30 cfu / 3 cfu
- *Penicillium spp.* → 900 Konidien / 90 Konidien / 9 Konidien
- *Aspergillus fumigatus* → 900 Konidien / 90 Konidien / 9 Konidien

Des Weiteren wurden verschiedene Negativkontrollen mitgeführt, um eine Kontamination der verwendeten Reagenzien und Chemikalien auszuschließen.

#### **Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung**

Wie in der ursprünglichen Vorhabensbeschreibung beschrieben, wurden die benötigten Reagenzien und Kits (exklusive Plastikmaterial und Geräte) versendet. Die Ringversuchsproben wurden vor Ort vom Kooperationspartner FINAR2.0-TV1 selbst hergestellt.

Es wurden keine Reagenzien und Kits zu weiteren Referenzlaboren versendet, da die multizentrische Phase des Ringversuches nicht stattfand.

### **10) FINAR2.0-TV3-AS5-AP4: Auswertung des Ringversuchs**

#### **Ziel laut Vorhabensbeschreibung**

Ein Ergebnisreport des Ringversuchs sollte erstellt werden.

## Ergebnisse

Die Ringversuchsproben wurden zunächst in einer monozentrischen Testung beim Kooperationspartner FINAR2.0-TV1 extrahiert und analysiert. Die Verifizierungsergebnisse (siehe Kapitel 6) der Biotype konnten dabei nicht bestätigt werden.

Die extrahierten Ringversuchsproben wurden daraufhin für eine Fehleranalyse zur Biotype geschickt. Hier lieferten die Experimente mit der Verifizierung nahezu vergleichbare Ergebnisse. Die Abweichungen können mit den folgenden Begebenheiten erklärt werden:

1. Die unterschiedlichen qPCR Cyler Modelle von Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE und Analytik Jena GmbH, Jena, DE scheinen einen größeren Einfluss zu haben als zu Beginn angenommen. Besonders in den Bereichen der LOD spielen selbst feine Unterschiede im Bereich der Optik und bei den verwendeten Thermoblöcken eine entscheidende Rolle.
2. Der gesamte Analyseprozess scheint maßgeblich von der Qualität der Extraktion abhängt. Die unter FINAR-TV3-AS4-AP1 bereits diskutierten Unterschiede bei der Auswahl der ersatzweise verwendeten Modelorganismen schien eine klare Abtrennung zwischen richtig und falsch positiven Proben im Bereich der Detektionsschwelle (LOD) zu erschweren. Vor allem die Reaktionen CAN (*Candida spp.*) und PAN (pan-fungal) in der Einschnitt-RT-qPCR zeigen, dass bei geringen Erregerkonzentrationen keine klare Trennung von positiven und negativen Probenmaterial möglich ist. Der mitunter sehr hohe humane Background und der Verlust von Erregermaterial während der Extraktion beeinflussen die Einschnitt-RT-qPCR in diesen Fällen zu stark, als dass eine robuste Reaktion ablaufen kann.
3. Laut den Erfahrungen des Kooperationspartners FINAR2.0-TV1 sind die Extraktions-Reagenzien zudem sehr anfällig für fungale Verunreinigungen. Das entwickelte Protokoll begünstigt diese Kontaminationen durch die einzelnen Arbeitsschritte außerdem noch.

Eine adäquate Lösung der aufgeführten Probleme konnte während des Vorhabens nicht mehr gefunden werden.

## Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung

Die Ergebnisse der monozentrischen Phase haben aufgezeigt, dass (1) die Präanalytik (Testprobenbereitung) und (2) die analytische Geräteumgebung noch erhebliche Einflüsse auf die Robustheit des gesamten Testes haben. Hinsichtlich der Präanalytik wurde ferner die Anzahl der händischen Schritte bemängelt. Diese sollten reduziert und/oder in Form eines automatisierbaren Protokolls verbessert werden. In der Summe kamen viele Einzelfaktoren zum Tragen, welche einer weiteren Optimierung bedürfen. Da dies im Rahmen des für das FuE-Vorhabens vorgegeben Zeitraums nicht möglich war, konnte der abschließende multizentrische Ringversuch nicht mehr durchgeführt werden.

## Zahlenmäßiger Nachweis

Siehe Formular „Zahlenmäßiger Nachweis gemäß Nr. 4.1 NKBF 2017“

Separat als Anhang verfügbar.

## Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit

Alle Arbeiten, die während des Vorhabenzeitraumes durchgeführt wurden, dienten der Entwicklung und Optimierung eines Extraktionsprotokolls und eines Einschritt-RT-qPCR-Multiplexes als Labormuster. Dabei wurden neue Methoden und Strategien vergleichend getestet, optimiert und wenn möglich verifiziert.

Das Arbeitspaket **FINAR-TV3-AS4-AP1: Präanalytik und Extraktion von Nukleinsäuren** war eines der umfangreichsten, da ein weites Spektrum an Methoden und Strategien recherchiert, eingeschätzt und wenn nötig experimentell getestet werden musste. Die Arbeiten umfassten mehrere Vergleiche von Methoden, Chemikalien, Enzymen und Extraktionskits, um ein robustes und schnelles Extraktionsprotokoll zu entwickeln. Zudem wurde eine Testung der Kurzzeitstabilität biochemisch empfindlicher Enzymformulierungen durchgeführt. Alle Reagenzien sollten auf ihre Qualität, Verfügbarkeit und Gebrauchstauglichkeit für eine spätere Nutzung für Produktentwicklungen getestet werden.

Im Arbeitspaket **FINAR-TV3-AS4-AP2: Herstellung von Referenzproben** konnte der Prozess für die Herstellung artifizierender DNA- und RNA-Templates schnell etabliert werden. Der Umgang mit den Lebendkulturen von *C. albicans* und *A. fumigatus* war bereits aus vorangegangenen Projekten bekannt und musste im Laufe des Vorhabens auf die Organismen *S. cerevisiae* und *A. oryzae* übertragen werden. Ein effizientes Protokoll für die In-vitro-Transkription konnte erarbeitet werden, welches generisch für weitere Produktentwicklung der Firma genutzt werden kann.

Im Arbeitspaket **FINAR-TV3-AS4-AP3: Etablierung einer Einschritt-RT-PCR und Vergleich zur PCR im Monoplex** wurden verschiedene Einschritt-RT-qPCR-Mixe bzw. Einzelenzyme recherchiert und getestet. Für zwei kommerziell erhältliche Einschritt-RT-qPCR-Mixe wurden umfangreiche Experimente inkl. verschiedener HotStart Testungen durchgeführt, um die Performance bestmöglich einschätzen zu können.

Das Arbeitspaket **FINAR-TV3-AS4-AP4: Vergleich von PCR und Einschritt-RT-PCR anhand von Nukleinsäuren aus vitalen Pilzen** umfasste Experimente mit den hergestellten artifizierten Templates. Es wurden DNA-RNA-Mischungen mit unterschiedlichen Versuchsaufbauten getestet, um die Templates DNA, RNA und TNA zu vergleichen.

Im Arbeitspaket **FINAR-TV3-AS4-AP5: Testung aller PCR-Monoplexe des Testprototyps aus FINAR als Einschritt-RT-PCR** wurden Monoplexe neu entworfen, wofür ein umfangreiches Primer- und Sondendesign stattfand. Dies war notwendig, um den bereits existierenden Prototyp aus dem Vorgängervorhaben FINAR zu optimieren.

Im Arbeitspaket **FINAR-TV3-AS4-AP6: Multiplex-RT-PCR Testprototyp und dessen Verifizierung** wurden die Monoplexe zu einem funktionierenden Multiplex zusammengeführt und verifiziert.

Die Arbeitspakete **FINAR2.0-TV3-AS5-AP1 bis FINAR2.0-TV3-AS5-AP4** umfassten sämtliche Phasen des Ringversuchs. Die benötigten Chemikalien und Reagenzien wurden eingekauft bzw. hergestellt, die Labormuster wurden inklusive Gebrauchsanweisung, Dokumentation und verkürzter Stabilitätstestung in einer Herstellungsumgebung erstellt, konfektioniert und verschickt. Die Nachanalyse der extrahierten Ringversuchsproben in der Biotype war eine ungeplante, jedoch notwendige Arbeit im Labor.

## Voraussichtliche Nutzung und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Eine direkte Verwertbarkeit des im Rahmen des FuE-Vorhabens erstellten Labormusters ist zu diesem Zeitpunkt nicht absehbar. In der monozentrischen Phase des Ringversuches hat sich gezeigt, dass der Prototyp zu stark auf die natürlich auftretenden Schwankungen bei der Anwendung in den unterschiedlichen Laboren reagiert. Ein Redesign der CAN- und PAN-Reaktionen ist anzuraten. Alternativ könnte der Einsatz einer Nested PCR zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität beitragen.

Der DNA-basierte Nachweis geringer Keimzahlen in Gegenwart eines großen Überschusses an humanen Blutzellen stellt eine besondere Herausforderung für einen molekularen Sepsistest dar. In der Umgehung dieser Hemmung können nach unserer Auffassung auch Alleinstellungsmerkmale für neue Testformate liegen. So lassen sich diese Erfahrungen auch für die Diagnostik von zirkulierenden Tumorzellen nutzen. Erste Kontakte zur Forschungsgruppe für Akustische Mikrosysteme (SAWLab Saxony) des Leibniz-Instituts für Festkörper- und Werkstoffforschung Dresden (IFW), welche über eine Technologie zur schnellen Anreicherung spezifischer Blutzellen forscht, wurde bereits geknüpft (siehe nächstes Kapitel).

In einer Einschnitt-Multiplex-RT-PCR lassen sich sowohl Mutationen als auch Genexpressionen simultan quantifizieren, wodurch sich neue Multiplex-Testformate darstellen lassen. Zusätzlich versprechen wir uns für spezifische Anwendungen im Vergleich zur komplementären DNA-Diagnostik höhere Sensitivitäten. Seit Juli 2018 verfügt die Biotype GmbH mit dem MODAPLEX® über eine proprietäre, patentgeschützte Analyseplattform, welche die qPCR mit der Kapillargelelektrophorese in einem Gerät vereint. Mit diesem Gerät lassen sich zurzeit bis zu 50 nukleinsäurebasierte Parameter gleichzeitig quantifizieren. Eine neue Version des Gerätes soll im dritten Quartal 2023 in den Markt eingeführt werden. Begleitend wird an einem Anwendungsportfolio gearbeitet, für welches die Erkenntnis des FuE-Vorhabens FINAR2.0-TV2 bereits umgesetzt werden sollen. Die Einschnitt-Multiplex-RT-PCR würde dieses Analysesystem deutlich verbessern und somit helfen neue Kunden zu gewinnen.

Die Biotype ist auch als Auftragsentwickler und -produzent tätig (auch als OEM- oder B2B-Geschäft bezeichnet). Dieser Geschäftszweig wird in der Firma stetig weiterentwickelt. Mit der neuen Entwicklungsplattform wird die Biotype auch für bestimmte Kundenentwicklungen attraktiver werden.

## Fortschritte von anderen Stellen während der Vorhabenslaufzeit

Anknüpfend an den Stand der Technik, welcher im Antrag ausführlich dargestellt wurde, ergaben sich im Rahmen des Berichtszeitraum durchaus neue Entwicklungen im Bereich der Erregerdiagnostik, wobei aufgrund der SARS-CoV2-Pandemie eine klare Schwerpunktbildung in der wissenschaftlichen Literatur zu verzeichnen war. Die Sepsisdiagnostik mit einem speziellen Fokus auf dem molekularen Nachweis invasiver fungaler Infektionen (IFI) sowie kommerziell verfügbarer Kits und Systemlösungen fassten erneut Übersichtreferate von Kidd et al. (2020) und White et al. (2022), sowie eine Sonderausgabe des Journals of Fungi (ediert als Pdf-Reprint ISBN 978-3-03897-717-9 durch Kontoyiannis und Slavin, 2019) zusammen. Hinsichtlich der kommerziell verfügbaren Kits konnten im Vergleich zur Antragsrecherche keine Neuzugänge verzeichnet werden. Zur Lösung der Problemstellungen panfungaler PCR wird auf eine neue Standardisierungsinitiative der International Society for Human and Animal Mycoses (ISHAM) verwiesen. Erwähnenswert ist ferner erneut die US-IVD-Zulassung [FDA 510(k) Premarket Notification K173536] des T2Candida panel

und T2Dx instrument (PCR-Immuno-magnetresonanztechnologie, T2 Biosystems, Lexington, US-MA), welches den Erregernachweis direkt aus Vollblut erlaubt (LOD 1-3 Cfu, 91% Sensitivität, 99% Spezifität). Des Weiteren wird insbesondere auf Fortschritte der Aspergillen-Diagnostik aufgrund standardisierter Verfahren verwiesen (Haydour et al. 2019). Der therapeutische Erfolg einer frühzeitigen Aspergillen-PCR wird auch durch Lamberink et al. (2022) in einer retrospektiven Kohortenstudie von hämato-onkologischen Patienten unterstrichen.

Die Problemstellungen der Präanalytik sowie eine Sensitivitätssteigerung durch Nested-PCR und geometrisches Multiplexing werden vielfach technologisch durch Total Analysing Systems (TAS), welche besonders für syndromische Erregerpanels Verwendung finden, adressiert. Mit dem Vivalytic Analyser (Bosch Healthcare Solutions GmbH, Waiblingen, DE), Ronda Disc Analyser (Spindiag GmbH, Freiburg, DE) und QIAstat-Dx Analyser (Qiagen, Hilden, DE) sind u.a. drei deutsche Unternehmen vertreten. Allerdings gibt es bisher keine IFI-Kartuschen für diese oder verwandte Systeme.

Die Forschungsgruppe für Akustische Mikrosysteme (SAWLab Saxony) des Leibniz-Instituts für Festkörper- und Werkstoffforschung Dresden (IFW) beschäftigt sich ferner mit der Möglichkeit der kontinuierlichen Aufreinigung komplexer Biofluide mittels akustischer Oberflächenwellen. Diese Methode basiert auf den unterschiedlichen Verhaltensweisen der verschiedenen Partikel, sobald diese hochfrequenten Schallwellen ausgesetzt sind und kann u.a. zur An- bzw. Abreicherung bestimmter Zellen aus komplexen Gemischen wie Vollblut genutzt werden (Richard et al. 2019).

Fortschritte der neuen massiv parallelen Sequenziertechnologien (*syn.* NGS – Next Generation Sequencing), welche zu zeitlichen und preislichen Reduktionen der Analyseverfahren führten, werden zusehens auch für die Sepsisdiagnostik genutzt (Grumaz et al. 2020, Yu et al. 2021, Avershina et al. 2022; insbesondere Sequencer von Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). Einen besonders interessanten Ausblick bietet die mikrobielle Metagenomanalyse (mNGS) aus freier zirkulierender Nukleinsäure im Plasma der Patienten (Wang et al. 2023, Zhu et al. 2023). Durch selektive Anreicherung von Nukleinsäuresequenzen bei der Darstellung von NGS-Bibliotheken lässt sich der Überschuss an humaner Nukleinsäure deutlich reduzieren. Durch entsprechende PCR-Panels lassen sich auch molekulare Erreger- und Resistenznachweise kombinieren (skalierbares Multiplexing). NGS-Technologien erlauben generell eine digitale Auswertung mit absoluter Quantifizierung und basieren teilweise auf einer Nested-PCR, wie beispielsweise für die kombinierte Darstellung der Sequenzierbibliotheken und der Amplifikation auf dem Chip/Flusszelle gezeigt (MiniSeq™ Sequencing System, Illumina Inc., San Diego, US-CA oder IronTorrent™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US-MA). Durch die Anwendung der NGS lassen sich künftig auch immunologische und pathophysiologische Expressionsmuster für die Frühdiagnose einer Sepsis nutzen (Arora et al. 2023) und mit molekularen Erreger- und Resistenznachweisen kombinieren.

Mit der Ausgründung der biophotonics diagnostics GmbH (Jena, DE) aus dem Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. (Jena, DE) werden schließlich RAMAN-spektroskopische Verfahren zum Nachweis von Erregern und Resistenztestungen verfolgt. Diese versprechen insbesondere eine schnelle Resistenztestung lebender Erreger in Kombination mit einer erheblich verkürzten Erregerkultivierung.

#### Referenzen:

Arora J, Mendelson AA, Fox-Robichaud A (2023). Sepsis: Network Pathophysiology and implications for Early Diagnosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2023 Mar 6. doi: 10.1152/ajpregu.00003.2023. Epub ahead of print. PMID: 36878489.

Avershina E, Frye SA, Ali J, Taxt AM, Ahmad R. Ultrafast and Cost-Effective Pathogen Identification and Resistance Gene Detection in a Clinical Setting Using Nanopore Flongle Sequencing. *Front Microbiol.* 2022 Mar 17;13: 822402. doi: 10.3389/fmicb.2022.822402. PMID: 35369431; PMCID: PMC8970966.

Grumaz C, Hoffmann A, Vainshtein Y, Kopp M, Grumaz S, Stevens P, Decker SO, Weigand MA, Hofer S, Brenner T, Sohn K. Rapid Next-Generation Sequencing-Based Diagnostics of Bacteremia in Septic Patients. *J Mol Diagn.* 2020 Mar;22(3): 405-418. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.12.006. PMID: 32146977.

Haydour Q, Hage CA, Carmona EM, Epelbaum O, Evans SE, Gabe LM, Knox KS, Kolls JK, Wengenack NL, Prokop LJ, Limper AH, Murad MH. Diagnosis of Fungal Infections. A Systematic Review and Meta-Analysis Supporting American Thoracic Society Practice Guideline. *Ann Am Thorac Soc.* 2019 Sep;16(9): 1179-1188. doi: 10.1513/AnnalsATS.201811-766OC. PMID: 31219341.

Kidd SE, Chen SC, Meyer W, Halliday CL (2020). A New Age in Molecular Diagnostics for Invasive Fungal Disease: Are We Ready? *Front Microbiol.* 2020 Jan 14; 10: 2903. doi: 10.3389/fmicb.2019.02903. PMID: 31993022; PMCID: PMC6971168.

Kontoyiannis DP, Slavin M (2019). Reprint of articles from the Special Issue published online in the open access journal *Journal of Fungi* (ISSN 2309-608X) from 2018 to 2019. Editorial Office MPDI, ISBN 978-3-03897-717-9 (pdf).

Lamberink H, Wagemakers A, Sigaloff KCE, van Houdt R, de Jonge NA, van Dijk K (2022). The impact of the updated EORTC/MSG criteria on the classification of hematological patients with suspected invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2022 Aug;28(8):1120-1125. doi: 10.1016/j.cmi.2022.02.026. Epub 2022 Mar 3. PMID: 35248746.

Richard C, Fakhfour A, Colditz M, Striggow F, Kronstein-Wiedemann R, Tonn T, Medina-Sánchez M, Schmidt OG, Gemming T, Winkler A (2019). Blood platelet enrichment in mass-producible surface acoustic wave (SAW) driven microfluidic chips. *Lab Chip.* 2019 Dec 21;19(24):4043-4051. doi: 10.1039/c9lc00804g. Epub 2019 Nov 14. PMID: 31723953.

Wang L, Li S, Qin J, Tang T, Hong J, Tung TH, Xu C, Yu S, Qian J. Clinical Diagnosis Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing of Plasma in Suspected Sepsis. *Infect Drug Resist.* 2023 Feb 14; 16:891-901. doi: 10.2147/IDR.S395700. PMID: 36820080; PMCID: PMC9938705.

White PL, Alanio A, Brown L, Cruciani M, Hagen F, Gorton R, Lackner M, Millon L, Morton CO, Rautemaa-Richardson R, Barnes RA, Donnelly JP, Loffler J; Fungal PCR Initiative (2022). An overview of using fungal DNA for the diagnosis of invasive mycoses. *Expert Rev Mol Diagn.* 2022 Feb;22(2):169-184. doi: 10.1080/14737159.2022.2037423. Epub 2022 Feb 16. PMID: 35130460.

Yu J, Diaz JD, Goldstein SC, Patel RD, Varela JC, Reyenga C, Smith M, Smith T, Balls J, Ahmad S, Mori S. Impact of Next-Generation Sequencing Cell-free Pathogen DNA Test on Antimicrobial Management in Adults with Hematological Malignancies and Transplant Recipients with Suspected Infections. *Transplant Cell Ther.* 2021 Jun;27(6): 500.e1-500.e6. doi: 10.1016/j.jtct.2021.02.025. Epub 2021 Feb 26. PMID: 33849818.

Zuo YH, Wu YX, Hu WP, Chen Y, Li YP, Song ZJ, Luo Z, Ju MJ, Shi MH, Xu SY, Zhou H, Li X, Jie ZJ, Liu XD, Zhang J. The Clinical Impact of Metagenomic Next- Generation Sequencing (mNGS) Test in Hospitalized Patients with Suspected Sepsis: A Multicenter Prospective Study. *Diagnostics (Basel).* 2023 Jan 16;13(2):323. doi: 10.3390/diagnostics13020323. PMID: 36673134; PMCID: PMC9857658.

## Erfolgte oder geplante Veröffentlichung der Ergebnisse

Eine gemeinsame Publikation der Verbundpartner ist erschienen:

Barber AE, Riedel J, Sae-Ong T, Kang K, Brabetz W, Panagiotou G, Deising HB, Kurzai O (2020). Effects of Agricultural Fungicide Use on *Aspergillus fumigatus* Abundance, Antifungal Susceptibility, and Population Structure. *mBio*. 2020 Nov 24;11(6):e02213-20. doi: 10.1128/mBio.02213-20. PMID: 33234685; PMCID: PMC7701986.

Die Biotype plant zurzeit keine weitere Veröffentlichung ihrer Ergebnisse.