

Molekulare Marker zur Diagnostik von Schimmelpilzen und Actinobakterien unter Berücksichtigung von Erregern invasiver Mykosen

Molecular Markers for Diagnosing Mould and Actinobacteria, with Consideration of Pathogens of Invasive Mycoses

Projektleiter
Project Leader:
Kordula Jacobs

Projektbearbeiter
In-charge:
Kordula Jacobs,
Katharina Plaschkies,
Natalie Rangno

Förderinstitution
Funding Institution:
BMW/INNO-KOM-Ost

AUSGANGSSITUATION UND ZIELSTELLUNG

Die qualitative und quantitative Bestimmung von Schimmelpilzen und Actinobakterien ist eine wesentliche Grundlage für baubiologische Expertisen (insbesondere im Bereich Wohnraumhygiene und Innenraumdiagnostik) sowie ausgewählte Bereiche der klinischen Diagnostik. Beide Organismengruppen schließen Auslöser gesundheitlicher Beschwerden und Krankheitserreger ein, deren Erkennung, Vermeidung und Bekämpfung eine taxonomische Zuordnung und quantitative Bewertung erfordern.

Ziel des Projektes war die Entwicklung universeller molekularer Marker für den quantitativen Nachweis von gesundheitsgefährdenden Schimmelpilzen und Actinobakterien in verschiedenen diagnostischen Anwendungen. Dazu sollten Systematik und Taxonomie der relevanten Organismengruppen analysiert sowie geeignete Differenzierungsmarker identifiziert und evaluiert werden. Eine beispielhafte praktische Applikation war im Bereich der Innenraumdiagnostik zu realisieren. Als methodische Basis wurde dabei die sondenbasierte Real-Time-PCR-Technologie genutzt.

METHODEN

Verschiedene Stämme der relevanten Pilz- und Bakterienarten wurden aus Umweltproben isoliert oder von Stammsammlungen bezogen, phänotypisch verifiziert und zur Gewinnung genomischer DNA eingesetzt.

INITIAL SITUATION AND OBJECTIVE

The qualitative and quantitative determination of mould and actinobacteria is a crucial basis for biological expert opinions on buildings (especially in the area of living space hygiene and the diagnostics of interior rooms) and selected areas of clinical diagnostics. Both groups of organisms include trigger factors for ailments and pathogens, whose detection, avoidance and control require taxonomic allocation and quantitative evaluation. The objective of the project was to develop universal molecular markers for the quantitative proof of mould and actinobacteria hazardous to health in several diagnostic applications. For that purpose, the systematics and taxonomy of the relevant groups of organisms were to be analysed and suitable differentiation markers identified and evaluated. An exemplary practical application was to be implemented in the field of interior diagnostics. Thereby, the probe-based real-time PCR technology was used as a methodological basis.

METHODS

Several strains of relevant fungal and bacterial species were isolated from environmental samples or obtained from collections of strains and cultivated after phenotypic verification on respectively suitable culture media. The mycelia of the respective referential cultures were subsequently used for isolating the genomic DNA. Then, four core DNA regions of the various fungi were analysed with the help of earlier

Vier ausgewählte DNA-Regionen der verschiedenen Pilze wurden analysiert: die in hoher Kopiezahl im Genom auftretende ITS-Region (Internal transcribed spacer of nucleus ribosomal DNA) sowie partielle Bereiche der Gene Betatubulin (BET), Calmodulin (CAM) und Elongationsfaktor Alpha (ELO). Bei Actinobakterien erfolgte die Analyse der 16s-Region der ribosomalen DNA sowie des partiellen Gyrase-Gens (GYR).

Die erforderlichen universellen Amplifikations- und Sequenzierprimer wurden aus der Literatur entnommen oder aus verfügbaren geprüften Referenzsequenzen der NCBI (National Center of Biotechnology Information, USA) -Genbank abgeleitet. Die generierten Sequenzdaten der Referenzpilze und -bakterien wurden für die Rekonstruktion von phylogenetischen Stammbäumen, die Analyse der Systematik der beiden Organismengruppen sowie die Identifizierung der Genregionen mit dem höchsten Differenzierungspotenzial herangezogen. Für ausgewählte Pilz- und Bakterienarten wurden sondenbasierte Real-Time-PCR-Assays nach dem TaqMan-Prinzip entwickelt. Eine Überprüfung der prinzipiellen Funktionalität der Sondensysteme erfolgte zunächst im konventionellen PCR-Verfahren. Anschließend wurden funktionsfähige Systeme in Real-Time-PCR-Assays überführt und hinsichtlich Amplifikationseffizienz, Spezifität und Nachweisgrenze optimiert.

ERGEBNISSE

Aufgrund ihrer hohen Praxisrelevanz wurden die Schimmelpilze *Alternaria alternata*, *Au-*

R&D findings and literature research: the ITS region (internal transcribed spacer of nucleus ribosomal DNA) occurring in a high copy count in the genome and partial areas of the genes beta-tubulin (BET), calmodulin (CAM) and the elongation factor alpha (ELO). In actinobacteria, the 16s region of the ribosomal DNA and of partial gyrase gene (GYR) was analysed.

The required universal amplification and sequencing primers were obtained from the literature or derived from available, tested referential sequences in the NCBI (National Center of Biotechnology Information, USA) gene bank. The generated sequence data of the referential fungi and bacteria were involved for reconstructing phylogenetic trees, for analysing the systematics of the two groups of organisms and for identifying the gene regions of the highest differentiation potential.

Probe-based real-time PCR assays were developed according to the TaqMan principle for selected fungal and bacterial species. The principal functionality of the probing systems was at first verified by the conventional PCR method. Thereafter, functional systems were transferred to real-time PCR assays and optimised regarding amplification efficiency, specificity and detection limits.

RESULTS

Due to their high practical relevance, the moulds *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus versicolor* Sektion, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Penicil-*

reobasidium pullulans, *Aspergillus versicolor* Sektion, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium glabrum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Stachybotrys chartarum* und *Fusarium oxysporum* sowie die Actinobakterien *Streptomyces griseus*, *Nocardia carnea* und *Nocardiopsis alba* als Zielorganismen der genetischen Bearbeitung und diagnostischen Entwicklung festgelegt.

Mehrere Stämme dieser Organismen sowie systematisch ausgewählter Vergleichsorganismen (in der Gesamtheit ca. 150 Schimmelpilzstämme und 50 Actinobakterienstämme) wurden genetisch analysiert. Im Ergebnis konnten für jede Art die relevanten Sequenzdaten von bis zu vier verschiedenen DNA-Regionen generiert, hinsichtlich Differenzierungspotenzial bewertet und die geeigneten Regionen für die Ableitung spezifischer Marker ermittelt werden. Für eine Mehrzahl der Pilze erwiesen sich die Regionen BET oder ELO als vorteilhaft, für *Aspergillus*-Arten wurde CAM favorisiert und bei den Actinobakterien war eine eindeutige Differenzierung nur mit GYR möglich. Auf dieser Basis wurden für jeden Zielorganismus zwei spezifische Real-Time-Assays mit TaqMan-Sonden konzipiert. Nach einem Test der spezifischen Oligonukleotide mittels konventioneller PCR wurde jeweils ein Primer/Sonden-System favorisiert und für die Assay-Entwicklung zugrunde gelegt. Auf diese Weise wurden für acht Pilzarten und zwei Actinobakterien applikationsfähige Assays mit guter bis sehr guter Effizienz und Spezifität entwickelt.

Beispielhaft sind in Abb. 1 Ergebnisse für den Zielorganismus *Aspergillus fumigatus* dargestellt. Verschiedene Stämme dieser Art wurden mit dem entwickelten, auf das Calmodulin-Gen gerichteten Real-Time-PCR-Assay eindeutig zugeordnet, gleichzeitig traten keine falsch positiven Nachweise mit Fremdorganismen auf.

lium chrysogenum, *Penicillium glabrum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Stachybotrys chartarum* und *Fusarium oxysporum* as well as the actinobacteria *Streptomyces griseus*, *Nocardia carnea* und *Nocardiopsis alba* were specified as target organisms of genetic processing and diagnostic development.

Several strains of these organisms and of systematically selected referential organisms (in total approx. 150 strains of mould and 50 actinobacterial strains) were analysed genetically. As a result, relevant sequence data of up to four different DNA regions could be generated for each type of relevant sequence data. They could be evaluated regarding their differentiation potential, and the suitable regions for deriving specific markers could be ascertained. For a majority of fungi, the regions of BET or ELO appeared to be of advantage; CAM was favoured for the *Aspergillus* species and unambiguous differentiation was possible in actinobacteria with GYR only.

On such basis, two specific real-time assays were designed with TaqMan probes for each target organism. After a test of the specific oligonucleotides by way of conventional PCR, one primer/probe system each was favoured and used as a base for the development of assays. In that way, assays of good to very good efficiency and specificity that were fit for application to eight species of fungi and two actinobacteria were developed.

Fig. 1 shows exemplarily the results for the target organism *Aspergillus fumigatus*. Several strains of this species were unambiguously allocated to the newly developed real-time PCR assay that is directed onto the calmodulin gene; at the same time, no false positive proof occurred with extraneous organisms.

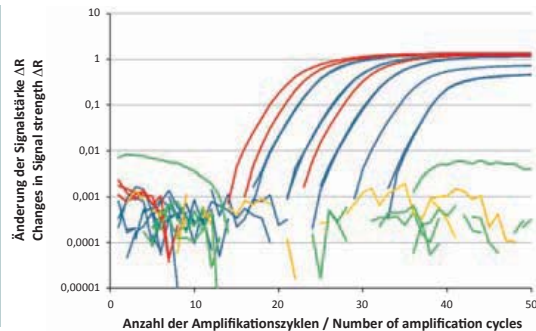


Abb.1: Amplifikationskurven einer Real-Time-PCR mit spezifischer Sonde für *Aspergillus fumigatus* (TaqMan-Prinzip);
 ■ Signale mit Standards von *A. fumigatus* DSM 819 im Bereich von 10 ng bis 1 pg genomischer DNA;
 ■ Signale mit den drei *A. fumigatus*-Stämmen IHD-13-17, C1 und MKJ (Befunde positiv);
 ■ Signale mit den Vergleichspilzarten *A. flavus* ATCC9643, *A. sydowii* CBS15, *A. niger* DSM 1957 und *A. ustus* fsu1272 (Befunde negativ);
 ■ Signale mit zwei Negativkontrollen ohne DNA-Zugabe (Befunde negativ).

Fig.1: Amplification graphs of a real-time PCR with a specific probe for *Aspergillus fumigatus* (TaqMan Principle);
 ■ Signals with standards of *A. fumigatus* DSM 819 in the range from 10 ng to 1 pg of genomic DNA;
 ■ Signals of the three *A. fumigatus* strains IHD-13-17, C1 and MKJ (findings positive);
 ■ Signals of comparable fungal species *A. flavus* ATCC9643, *A. sydowii* CBS15, *A. niger* DSM 1957 and *A. ustus* fsu1272 (findings negative);
 ■ Signals of two negative controls without DANN addition (findings negative).

Fazit

Für wichtige innenraum-relevante Schimmelpilz- und Bakterienarten konnten hinreichend spezifische Marker identifiziert und im Rahmen von Real-Time-PCRs erfolgreich getestet werden. Die praktische Applikation einzelner PCR-Assays erfordert eine umfassende weitere Optimierung und Validierung einschließlich Feldtests. Generell sind die entwickelten Marker auch für andere DNA-basierte diagnostische Technologien nutzbar, wie z. B. PCR-ELISA, Barcode-Sequenzierung sowie DNA-Microarrays bzw. Chips. Die im Projekt generierten phylogenetischen Daten sowie die methodische Vorgehensweise zur Entwicklung spezifischer Real-Time-PCR-Nachweise können für weitere diagnostische Fragestellungen, z. B. im Bereich der Phytopathologie, genutzt werden.

CONCLUSION

For important species of mould or bacteria of relevance to interior rooms, sufficiently specific markers could be identified and tested successfully within the scope of real-time PCRs. The practical application of individual PCR assays requires further comprehensive optimisation and validation, including field tests. The markers developed are principally utilisable in other DNA-based diagnostic technologies, such as PCR-ELISA, barcode sequencing and DNA microarrays or chips. The phylogenetic data generated in the project and the methodological approach to develop specific forms of real-time PCR proof can be used in further diagnostic issues, such as in the field of phytopathology.