

Michaela Becker
Dr. sc. hum.

Der PCR-Chip Assay: Entwicklung einer Multiplex Festphasen-PCR zur Differenzierung und Charakterisierung klinisch relevanter Bakterienspezies aus Blutkulturen

Geboren am 28.03.1975
Reifeprüfung am 14.06.1994
Studiengang Biologie und Germanistik (Staatsexamen) vom
SS/WS 1994/1995 bis zum SS/WS 1999/2000
Staatsexamens in Biologie und Germanistik am 31.05.2000 an der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Schmidt-Gayk

Ein großer Meilenstein innerhalb der modernen, molekularbiologischen Diagnostik besteht in der Integration neuer, genetischer Sequenzdateninformationen in diagnostische Technologien, die in spezifische, sensitive und automatisierbare Verfahren unter anderem auch zur bakteriellen Differenzierung implementiert werden können. Die Biochip-Technologie mit ihren miniaturisierten, automatisierbaren Hochdurchsatzverfahren besitzt das Potential, die genomische Analytik zu revolutionieren. Der PCR-Chip stellt eine technologische Kombination aus Biochip (Oligonukleotid-Array) und der etablierten PCR-Methodik dar, indem spezifische, enzymatische, Multiplex-Amplifikationsreaktionen im großen Maßstab durch die Immobilisierung auf einer Festphase synchronisiert und in einer automatisierten Datenanalyse analysiert werden können. Die Zielsetzung der vorliegenden Promotionsarbeit lag darin, die Machbarkeitsstudie eines PCR-Chip Assays durchzuführen. Als Applikation diente hierbei die Differenzierung und Charakterisierung der wichtigsten Sepsiserreger aus Blutkulturen. Sepsis und septischer Schock sind trotz frühzeitiger chirurgischer Intervention, gezielter antibiotischer Therapie und aufwendiger Verfahren der Überwachung von Organfunktionen nach wie vor eine der Haupttodesursachen von Patienten auf Intensivstationen. Die schnelle Analyse der Blutkultur, die sowohl in der Typisierung der Erreger als auch in der Charakterisierung seiner Antibiotikaresistenzen liegt, ist essentiell bei der Diagnose und Behandlung der Sepsis. Die Speziesidentifikation nach Determinierung einer positiven Blutkultur dauert innerhalb der konventionellen, mikrobiologischen Routinediagnostik gewöhnlich 24 bis 96 Stunden je nach unimikrobieller oder polymikrobieller Infektionsart. Die Dauer der Blutkulturanalyse unabhängig von Infektionsart (uni- oder polymikrobiell) kann durch den PCR-Chip-Assay auf 7 Stunden von Beginn der DNS-Isolierung aus den positiven Blutkulturen bis zur Beendigung der Datenanalyse verkürzt werden. Durch die schnellere Typisierung der Erreger und die schnellere Charakterisierung der genetisch bedingten Antibiotikaresistenzen kann auch der Therapiebeginn mit gezielten Antibiotika, die auf die jeweilige Spezies und die Resistenz hin abgestimmt sind, beschleunigt werden, was unter Umständen auch zu einer Reduktion der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen führen könnte.

Durch Nukleinsäure-basierende Nachweistests wie den PCR-Chip Assay können auch seltene und unerwartete Pathogene, die mit Hilfe der konventionellen Methoden in der Routinediagnostik oftmals schwer bestimmbar sind, mit der gleichen Spezifität und Sensitivität detektiert werden wie häufigere Keime.

Die Durchführung der Machbarkeitsstudie des PCR-Chip Assays vollzog sich in mehreren Schritten: zunächst wurden durch Sequenzierung neue Sequenzdaten ausgewählter Zielgene oder Fragmente von einer bakteriellen Stammkultursammlung gewonnen und in alignments zusammengestellt. Auf der Basis dieser alignments wurden Sequenz-spezifische Primerpaare entwickelt, die im nächsten Schritt evaluiert wurden. Die evaluierten Sequenz-spezifischen Primerpaare wurden auf einer Mikrochip-Oberfläche immobilisiert (Oligonukleotid-Array). Nach Optimierung verschiedener Parameter, die den PCR-Prozeß auf der Mikrochip-Oberfläche (PCR-on-Chip) beeinflussen, wurde die Primeranzahl auf dem PCR-Chip auf 40 verschiedene Primerpaare zur Typisierung von 32 bakteriellen Spezies und 4 verschiedenen bakteriellen Gattungen sowie zur Detektion von 5 verschiedenen Antibiotika-resistenzgenen erweitert.

Nach der Umstellung des PCR-Chip Assays auf klinisches Probenmaterial wurde der Assay in einer Anwendung mit 95 Patientenblutkulturen mit den konventionellen Methoden in der Routinediagnostik verglichen. Der PCR-Chip Assay zeigte hierbei 100% Spezifität, 98,9% Sensitivität, 100% positiven Voraussagewert und 99,9% negativen Voraussagewert. Diese Ergebnisse unterstreichen die mit den Methoden der Routinediagnostik vergleichbare hohe Spezifität und Sensitivität bei gleichzeitiger Reduktion der benötigten Analysedauer auf 7 Stunden.

Durch die zunehmende Aufklärung der meist polygenetisch bedingten, molekularen Ursachen vieler Antibiotikaresistenzen könnte die oftmals problematische, phänotypische Charakterisierung in Zukunft durch einen molekularen Nachweistest wie den PCR-Chip Assay rückbestätigt werden, der eine vielfache Multiplex-Analyse ohne Verlust von Spezifität oder Sensitivität mit einer automatisierten Datenanalyse zuläßt.

Der PCR-Chip Assay besitzt vor allem in Zukunft das Potential, eine Alternative zu biochemischen, immunologischen oder phänotypischen Methoden innerhalb der mikrobiologischen Diagnostik bieten zu können.