

# Zusammenfassung

Christoph Coutard

Dr. med. dent.

## **Evaluation neuer molekularbiologischer Methoden zur Erkennung nosokomialer Transmissionen von *Pseudomonas aeruginosa***

Fach/Einrichtung: Hygiene/Infektiologie

Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Dennis Nurjadi

Ausbrüche von multiresistenten *Pseudomonas aeruginosa* in medizinischen Einrichtungen, welche bei immunsupprimierten Patienten mit schwerwiegenden Komplikationen verbunden sein können, sind immer noch ein gegenwärtiges Problem. Feuchte Umgebungen wie die wasserleitenden Systeme der Krankenhäuser können als Reservoir und Infektionsquelle für derartige Ausbrüche ursächlich sein. Für die effektive Ermittlung der mikrobiologischen und epidemiologischen Zusammenhänge solcher Ausbrüche und deren Erreger werden verschiedene Typisierungsmethoden eingesetzt. Basierend auf Proben eines *Pseudomonas aeruginosa* Ausbruches im Zentrum für Innere Medizin der Universitätsklinik Heidelberg, der sich durch immer wiederkehrende Infektionen von 2008 bis 2014 auszeichnete, sollte untersucht werden, ob die Randomly-Amplified-Polymorphic-DNA-Polymerase-Kettenreaktion (RAPD-PCR), ein ausreichend genaues und somit geeignetes Verfahren ist, um nosokomiale Transmissionen von *Pseudomonas aeruginosa* frühzeitig zu erkennen und Ausbruchscluster zuverlässig und zeitnah zu identifizieren. Zur Beurteilung der Genauigkeit der RAPD-PCR wurden Proben, die während des Ausbruchs gewonnen wurden, zusätzlich mittels Whole Genome Sequencing (WGS) analysiert und anschließend wurden die Ergebnisse der beiden Verfahren miteinander verglichen. Es wurden mit beiden Methoden, 23 Patientenisolate und 15 Umweltproben, die in dem Ausbruchszeitraum von 2008-2014 gewonnen wurden, untersucht. Die RAPD-PCR wurde mit zwei zu der Spezies passenden Random Primer P272 und P208 durchgeführt, mit einem Kappillarelektrophoresegerät (QIAxcel) der Firma QIAGEN visualisiert und mithilfe des Softwareprogrammes „BioNumerics“ ausgewertet. Das WGS im Sinne einer Short-Read-Sequenzierung des ganzen Genoms erfolgte mit einem MiSeq System (Illumina, Inc). Die Rohdaten wurden ebenfalls in das Softwareprogramm „BioNumerics“ übertragen. Anschließend wurden die Rohdaten mithilfe einer Core Genome Multilokus Sequenz Typisierung (cgMLST) und eines Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Ansatzes analysiert. Bei der Analyse der 38 Isolate

ergab die RAPD-PCR bei einem Übereinstimmungs-Cutoff von 90% für beide Primer ein eindeutiges Cluster, welches die Isolate inkludierte, deren Bandenmuster eine Übereinstimmung von über 90% hatten. Der Primer 272 inkludierte 20 Patienten und fünf Umweltisolate in das Cluster, wohingegen der Primer 208 nur 17 Patienten und zwei Umweltproben in das Cluster inkludierte. Beim direkten Vergleich der Ergebnisse der RAPD-PCR mit den Ergebnissen des WGS ergaben sich somit für den Primer 272 zwei falsch positive und für den Primer 208 fünf falsch negative Isolate. Demzufolge identifizierte der Primer 272 zwei Isolate als nah verwandt und somit als mögliche Ausbruchs isolate, welche mittels WGS nicht als Ausbruchs isolate identifiziert wurden. Der Primer 208 hingegen identifizierte fünf Isolate als nicht nah verwandt und somit nicht als Ausbruchs isolate, die jedoch im WGS als Ausbruchs isolate identifiziert wurden. Eine zusätzlich durchgeführte kombinierte Primeranalyse, bei der der Durchschnitt der Gelbandenvergleich von Primer 272 und 208 berechnet wurde, ergab beim Vergleich mit dem WGS vier falsch negative und zwei falsch positive Isolate. Die kombinierte Primeranalyse, welche ein Versuch war, durch die Kombination beider Primer eine höhere Auflösung und somit genauere Ergebnisse zu bekommen, hatte keinen Mehrwert für die Ergebnisse der RAPD-PCR. Die Ergebnisse der SNP-Analyse und der cgMLST-Analyse, stimmten bei der Identifizierung der Ausbruchs isolate überein. Betrachtete man jedoch die Information der genetischen Übereinstimmung der Isolate im Detail, wurden Unterschiede deutlich. Aufgrund einer grundsätzlich höheren Auflösung des SNP-Ansatzes gegenüber dem cgMLST und einer deutlich höheren Anzahl an berücksichtigten Genen bei der SNP-Analyse, wurden die Ergebnisse der SNP-Analyse als aussagekräftiger erachtet. Aufgrund von zwei falsch positiven und vier falsch negativen Ergebnissen bei der RAPD-PCR, scheint die Methode letztendlich für die Erkennung von *Pseudomonas aeruginosa* 4MRGN Ausbrüchen nur teilweise geeignet. WGS dagegen scheint zuverlässig, liefert wichtige Informationen und sollte daher vorgezogen werden. Aufgrund der sinkenden Kosten und der ausgezeichneten Reproduzierbarkeit, sollte WGS als Standard-Typisierungsmethode bei derartigen Ausbrüchen eingesetzt werden. Die RAPD-PCR kann jedoch mit Primer 272 als günstige und schnelle Erstscreening Methode eingesetzt werden, sollte jedoch im Anschluss, in jedem Fall durch ein hochauflösendes Verfahren wie WGS abgesichert werden. Für die Verbesserung der Auflösung der RAPD-PCR sollte außerdem ein zweiter, anstelle von Primer 208 besser geeigneter Primer gefunden werden.