

Laura Kleinichen

Dr. med.

Entwicklung eines Desoxyribonukleinsäure-basierten Schnelltests zum Nachweis von *Yersinia pestis*: Vergleich von Extraktionsmethoden und Hybridisierungsbedingungen

Fach/Einrichtung: Hygiene

Doktorvater: unbetreut

Bei *Yersinia pestis* handelt es sich um ein gramnegatives Stäbchen, welches der Familie der Enterobacteriaceae zuzuordnen und weltweit in Naturherden zu finden ist. Es verursacht die Pest, welche mit der Beulen-, Lungenpest und Pestsepsis in drei Hauptmanifestationsformen unterschieden werden kann. Unbehandelt weist eine Infektion eine hohe Letalität auf, so dass die Diagnostik einen besonderen Stellenwert einnimmt. Bei Infektionsverdacht erfolgt diese derzeit mittels kultureller Anzucht und/oder molekularbiologischem Nachweis. Beide Verfahren sind zeitintensiv und hauptsächlich nur unter Laborbedingungen durchführbar, so dass sich der antibiotische Therapiebeginn dadurch verzögern kann. Es gibt zwar einen Fraktion-1-Antigen-Schnelltest auf dem Markt. Dieser ist aber derzeit nicht für die Diagnostik zugelassen. Außerdem wird dieser Analyt erst bei 37°C vom Erreger exprimiert. Die optimale Wachstumstemperatur von *Yersinia pestis* liegt allerdings bei 28°C, so dass zusätzlich eine Diagnostiklücke besteht. Die Entwicklung eines DNA-basierten Schnelltests zum Nachweis von *Yersinia pestis* könnte diese schließen. Der gedachte Testablauf sah dabei eine Hybridisierung zwischen extrahierter DNA von *Yersinia pestis* mit einer markierten Sonde in Lösung vor. Im anschließenden Lateral Flow Assay sollte eine Hybridisierung zwischen dem Hybridisierungsprodukt und auf einer Membran immobilisierten Capture-Oligonukleotiden (Capture-YP und Capture-Control) stattfinden. Dabei sollte an die Testlinie, die aus immobilisierter Capture-YP bestand, die mittels Sonde markierte DNA von *Yersinia pestis* binden. Als Kontrolllinie fungierte immobilisierte Capture-Control, an welche nur die markierte Sonde binden konnte. Auf dem Markt gibt es für andere Erreger ähnliche Testformate, die allerdings meist einen vorgeschalteten DNA-Amplifikationsschritt benötigen. Ziel dieser Arbeit war es für das gedachte Testformat eine geeignete DNA-Extraktionsmethode für *Yersinia pestis* und optimale Hybridisierungsbedingungen zwischen DNA von *Yersinia pestis*, markierter Sonde sowie Capture-Oligonukleotiden zu finden. Dazu wurden acht verschiedene Extraktionsmethoden unter Gesichtspunkten wie Reinheit,

Durchführbarkeit, Vorhandensein der Zielsequenz und Ausbeute miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich keine Extraktionsmethode wesentlich überlegen, so dass für das gesuchte Testformat entweder eine andere Extraktionsmethode genutzt werden muss oder Anforderungsabstriche erfolgen sollten.

Zum Vergleich der einzelnen Hybridisierungsparameter erfolgten verschiedene Hybridisierungsansätze und mit der Gelelektrophorese, dem Southern Blot mit anschließender Biotin-Detektion sowie Dot Blot verschiedene Hybridisierungsprodukt-nachweismethoden. Trotz Konzentrationsveränderungen der Hybridisierungsausgangprodukte von DNA von *Yersinia pestis* und Biotin-markierter Sonde, verschiedener Durchführungen und Varianz des Hybridisierungspuffers konnte auch nach numerischer Darstellung mit dem Programm Image J kein eindeutiger Hybridisierungserfolg mittels Gelelektrophorese oder Southern Blot mit Biotin-Detektion nachgewiesen werden. Allerdings ist davon auszugehen, dass eine Sondenbindung an kleinere Fragmente erfolgt sein musste.

Aufgrund der zeitlichen Aufwändigkeit und zur Ressourcensparung wurde ein Methodikwechsel auf den Dot Blot durchgeführt und verschiedene Hybridisierungspartner und -bedingungen untersucht. Bei der Hybridisierung zwischen immobilisierter DNA von *Yersinia pestis*/anderer Erreger und markierten Capture-Oligonukleotiden zeigte sich trotz Verwendung verschiedener Hybridisierungspuffer, -ausgangskonzentrationen/-stoffmengen, -zeiten, Denaturierungsverfahren, -agensstoffmengen, Waschvorgängen und Detektionsverfahren mit dem Nachweis von Negativkontrollen (z. B. Hybridisierungsprodukts aus Capture-Control und DNA von *Yersinia pestis*) ein unspezifisches Farbsignal.

Bei der Hybridisierung zwischen immobilisierter DNA von *Yersinia pestis* und markierter Sonde stellte sich entweder nur ein Hintergrundsignal oder unter Änderung der Hybridisierungsbedingungen eine unspezifische Farbreaktion dar. Eine Änderung der Durchführung, bei welcher die Capture-Oligonukleotide auf einer Membran immobilisiert und mit markierten Sonden hybridisiert wurden, führte trotz Änderung der Markierung, des Hybridisierungspuffers, der -zeit und -temperatur lediglich zu einem Hintergrundsignal. Ein Grund für die auf der einen Seite unspezifische Hybridisierung zwischen immobilisierter DNA und Capture-Oligonukleotiden und auf der anderen Seite fehlenden Hybridisierung zwischen immobilisierten Capture-Oligonukleotiden und markierter Sonde ergab sich nicht. Optimale Hybridisierungsbedingungen konnten dem zu Folge mit dieser Arbeit zwar nicht bestimmt werden, aber es wurde zur Erlangung der Ergebnisse eine breite Methodik angewandt. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wird bei der

Weiterführung der Entwicklung des DNA-basierten Schnelltests für *Yersinia pestis* eine Abweichung vom gedachten Testformat erfolgen. Es soll außerdem ein vorangestellter Amplifikationsschritt durchgeführt werden.