

Ulrich Eigner

Dr. sc. hum.

## **Schnelle, direkte molekulargenetische Differenzierung bakterieller Sepsiserreger aus Blutkulturen im Multiplexverfahren**

Geboren am 30.07.1964

Diplom der Fachrichtung Biologie am 13. März 1995 and der Universität TH Karlsruhe

Promotionsfach: Labormedizin/ Schwerpunkt Mikrobiologie

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

Die mikrobiell verursachte Sepsis ist trotz verbesserter Untersuchungsverfahren immer noch verbunden mit einer hohen Morbidität und Mortalität. Aus diesem Grund gehört der Nachweis der Mikroorganismen aus dem Blut zu den wichtigsten mikrobiologischen

Untersuchungsverfahren. Methode der Wahl für die Detektion der Erreger ist hierbei die Blutkultur. Die nachfolgende schnelle und zuverlässige Identifizierung der Erreger ist wichtig für die rechtzeitig eingeleitete und zielgerichtete Antibiotikatherapie und trägt entscheidend zur Senkung der Letalität bei. Bei der konventionellen mikrobiologischen Routinediagnostik dauert der Nachweis für gewöhnlich 24 bis 72 Stunden bis zur endgültigen Identifizierung der Erreger. Molekularbiologische Verfahren stellen eine Möglichkeit des sensitiven und spezifischen Nachweises der bakteriellen Erreger in kurzer Zeit dar. Diese Vorteile können auf die Blutkulturdiagnostik übertragen werden.

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung eines molekulargenetischen Makroassays zur Identifizierung eines breiten Spektrums bakterieller Sepsiserreger und der Detektion der wichtigen *van*- und *mecA*-Resistenzgene direkt aus der Blutkultur. Als Grundlage diente das Verfahren der Reversen Hybridisierung, bei dem der Nachweis amplifizierter Ziel-DNS durch Sonden anhand einer Färbereaktion erfolgt. Als Zielgene dienten Bereiche des bakteriellen 23S rRNS-Gens, des *tuf*-Gens, sowie der *van*- und *mecA*-Antibiotikaresistenzgene. Die durch Sequenzierung ausgewählter DNS-Fragmente oder durch Recherche an Sequenzdatenbanken erhaltenen Sequenzdaten wurden zu Alignments zusammengestellt. Unter Anwendung biochemischer und physikalischer Parameter der Sondentechnik wurden aus den Sequenzalignments spezifische Oligonukleotidsonden und Amplifikationsprimer entwickelt. Die auf Membranstreifen immobilisierten DNS-Sonden

wurden bezüglich der Bindungskapazität und Trennschärfe optimiert und modifiziert. Für die Endversion des Assays wurden 36 Gensonden für 29 Spezies konstruiert. Die Validation der Spezifität der DNS-Sonden erfolgte an 284 Referenzstämmen aus verschiedenen Stammsammlungen (u.a. ATCC, DSMZ, RKI). Nach der Evaluierung einer optimierten Methode der Extraktion bakterieller DNS aus Blutkulturmaterial erfolgte die Abstimmung des Multiplex-Primermixes und der PCR-Reaktion. Mit den festgelegten Parametern konnte nach Durchführung von Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen bakteriellen Referenzstämmen eine Nachweisgrenze von ca.  $10^4$  koloniebildenden Einheiten pro ml Blutkultur errechnet werden. Die Evaluation des entwickelten Hybridisierungstestes erfolgte an 549 vom BACTEC 9240 als positiv gemeldeten Patienten-Blutkulturen. Die Identifizierungsergebnisse wurden mit den konventionellen Methoden in der Routinediagnostik verglichen. Für insgesamt 529 der isolierten Erreger waren DNS-Sonden auf den Teststreifen verfügbar, davon konnten 521 korrekt identifiziert werden. Die aus den Resultaten der Evaluation errechnete Spezifität und Sensitivität der entwickelten Gensonden zeigte durchschnittlich Werte über 95%.

Der hier entwickelte Hybridisierungsassay ermöglichte somit die zeitnahe und exakte Identifizierung der wichtigsten Sepsiserreger und der *van*- und *mecA*-Resistenzgene nach direkter DNS-Extraktion aus der positiven Blutkultur. Durch die Möglichkeit der Übertragung der DNS-Sondentechnik auf die Ebene des Chip-Assays bietet das hier entwickelte Format eine Basis für zukünftige Entwicklungen.