

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Johanna Preuß-Wössner)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Entwicklung einer Screening-PCR
zum Nachweis bakterieller DNA in humanen Proben**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Marcus Klein
aus Aachen

Kiel 2019

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Nicole von Wurmb-Schwark, Forensische Genetik und
Rechtsmedizin Institut für Hämatopathologie in Hamburg GmbH
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. Ulf Meyer-Hoffert, Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.02.2020

gez.: Priv.-Doz. Dr. Cornelius Courts, Institut für Rechtsmedizin

Entwicklung einer Screening-PCR zum Nachweis bakterieller DNA in humanen Proben

1. EINLEITUNG	1
1.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA).....	1
1.2 Bakterien.....	1
1.2.1 Struktur der Bakterienzelle	2
1.2.2 Genetische Organisation der Bakterien (Nukleoid)	2
1.2.3 Unterschiede zwischen menschlichem und bakteriellem Genom	3
1.2.4 Bakterien im menschlichen Organismus.....	3
1.2.5 Untersuchte Bakterienspezies	4
1.2.5.1 Staphylococcus aureus.....	4
1.2.5.2 Streptococcus pneumoniae	5
1.2.5.3 Enterococcus faecium	5
1.2.4.4 Pseudomonas aeruginosa	5
1.3 Gelenkflüssigkeit (Synovia)	6
1.3.1 Funktion	6
1.3.2 Zusammensetzung	6
1.3.3 Pathologische Veränderungen.....	6
2. ZIELSETZUNG	8
3. MATERIAL UND METHODEN	9
3.1 Material.....	9
3.1.1 Untersuchte Bakterienspezies	9
3.1.2 Probenmaterial	9
3.1.2.1 Definierte bakterielle DNA als Kontrollprobe	9
3.1.2.2 Speichelproben	10
3.1.2.3 Gelenkflüssigkeitsproben.....	10
3.2 DNA-Extraktion	10
3.2.1 Manuelle Extraktion mit dem Invisorb Spin Swab Kit (Stratec)	10
3.2.2 Manuelle Extraktion mit dem HAIN Lifescience BacExtract-Kit	11
3.2.3 Halbautomatische DNA-Extraktion auf dem King Fisher Flex (Thermo Scientific).	12

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	14
3.3.1 Grundlagen	14
3.3.2 „BAC-Screen“ Singleplex-PCR zur Identifikation ausgewählter Bakterienspezies..	15
3.4 DNA-Qualität und –Quantität	17
3.5 Kapillarelektrophoretische Fragmentanalyse	19
3.5.1 Prinzip der Kapillarelektrophorese	19
3.5.2 Durchführung.....	19
3.5.3 Auswertung.....	20
3.6 Erregerdiagnostik mittels DNA-STRIP-Technologie (GenoType Bac-IDent)	21
3.7 DNA-Sequenzierung.....	24
3.8 Sequenzdatenanalyse mit dem BLAST-Modul	25
3.9 Methodik des kulturellen Erregernachweises	25
4. ERGEBNISSE	28
4.1 Extraktionsverfahren	28
4.2 Singleplex-PCR Analyse der Bakterienspezies.....	31
4.2.1 Entwicklung und Validierung der Screening-PCR „BAC-Screen“	31
4.2.2 Identifikation ausgewählter Bakterienspezies	35
4.2.3 Identifikation ausgewählter Bakterienspezies in Synovia.....	38
4.3 Ergebnisvalidierung mittels BLAST Modul	41
4.4 Das GenoType Bac-IDent Kit	44
5. DISKUSSION	46
5.1 Probenauswahl	46
5.2 Extraktionsverfahren	46
5.3 Validierung der Screening-PCR	47
5.4 Einsatz der Singleplex-PCR „BAC-Screen“ als Screeningmethode in der Laborroutine	48
5.5 Gegenüberstellung des molekulargenetischen Testsystems und des kulturellen Erregernachweises.....	48
6. ZUSAMMENFASSUNG	50
7. ANHANG	52
8. LITERATURVERZEICHNIS	57

1. EINLEITUNG

1.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl.: deoxyribonucleic acid) besteht aus zwei Polynukleotidketten, die aus je vier verschiedenen Nukleotiden aufgebaut sind. Jedes Nukleotid setzt sich aus einer Desoxyribose, einem Phosphat-Anteil sowie einer der organischen Basen Adenin, Cytosin, Thymin oder Guanin zusammen (Watson & Crick, 1953). Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen sorgen für den Zusammenhalt der DNA-Stränge. Es bildet sich eine dreidimensionale Struktur, die sogenannte Doppelhelix. Dabei lagern sich die Basen der beiden DNA-Stränge komplementär zueinander an, sodass sich immer Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin gegenüberliegen (Alberts et al., 2011). Durch einen antiparallelen Verlauf der beiden Einzelstränge ergibt sich für die Enden der Doppelhelix ein 3'-Hydroxyl-Ende und ein 5'-Phosphat-Ende. Das Ablesen des DNA-Strangs erfolgt vom 5'- zum 3'-Ende, wobei die spezifische Abfolge der vier Basen die genetische Information für die Synthese von Proteinen codiert (Campbell et al., 2009).

1.2 Bakterien

Bakterien gehören als einzellige Mikroorganismen zu den Prokaryoten, da sie keinen Zellkern besitzen. Sie sind in ihrer Größe variabel und messen zwischen 1 – 5 µm. Ihre Vermehrung erfolgt durch Zellteilung. Bakterien erscheinen dabei in vielfältigen äußeren Formen. Kugelförmige Prokaryoten werden Kokken genannt. Sie kommen einzeln, paarweise (Diplokokken), als Ketten vieler Zellen (Streptokokken) oder in weintraubenartiger Ansammlung (Staphylokokken) vor. Stäbchenförmige Bakterien hingegen werden in der Gruppe der Bacilli zusammengefasst. Ihr Vorkommen ist meist singulär und selten in Gestalt von Streptobacilli als Kette mehrerer Stäbchen. Unter schrauben- oder spiralförmige Bakterien fällt darüber hinaus eine große Bandbreite kommaförmiger, langspiraliger oder korkenzieherähnlicher Spirochäten.

Mittels der im 19. Jahrhundert entwickelten Gram-Färbung besteht außerdem eine weitere Möglichkeit der systematischen Einteilung von Bakterien. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Bakterien anhand unterschiedlicher Zellwandzusammensetzung in die beiden Gruppen der gram-positiven bzw. gram-negativen Bakterien unterschieden werden

können. Dies hat insbesondere einen klinisch-therapeutischen Nutzen, da die Vertreter beider Gruppen beispielsweise unterschiedlich auf körpereigene Abwehrmechanismen reagieren oder verschieden zu Antibiotikaresistenzen neigen (Campbell et al., 2009).

Manche Bakterien haben die Fähigkeit entwickelt, beim Menschen Krankheiten auszulösen. Unter Virulenzfaktoren werden diesbezüglich die von speziellen bakteriellen Genen codierten Proteine verstanden, die bei einem Organismus zum Krankheitsausbruch führen. So sind eine Vielzahl dieser Virulenzfaktoren beispielsweise toxische Proteine, die durch Interaktion mit wichtigen Signalproteinen der Wirtszelle eine erleichterte Ansiedelung oder Vermehrung des Krankheitserregers möglich machen (Alberts et al., 2011).

1.2.1 Struktur der Bakterienzelle

Bakterien besitzen einen zellulären Aufbau. Dabei umhüllt und stabilisiert eine Zellwand aus Peptidoglykanen (Murein) das Bakterium nach außen hin. Grampositive Bakterien weisen mit bis zu 40 Mureinschichten eine dickere Zellwand (15 – 80 nm) als gramnegative Bakterien auf (10 – 20 nm). Diese aus einer Phospholipiddoppelschicht bestehende Zellmembran dient als selektive Permeabilitätsbarriere. Sie ermöglicht durch kontrollierten Stoffaustausch eine Stabilität des inneren Milieus (Hof & Dörries, 2009).

Viele Prokaryoten besitzen darüber hinaus eine die Zellwand nach außen umhüllende Kapsel. Diese klebrige Schicht aus Polysacchariden und Proteinen stellt eine Anheftungsunterlage für Oberflächen oder Kolonien dar. Sie kann außerdem die Zelle vor Austrocknung und pathogene Bakterien vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus bewahren (Campbell et al., 2009).

Der Zellwand liegt innen eine Zytoplasmamembran an. Im Inneren der Bakterienzelle befindet sich das Zytoplasma mit den dort ansässigen Zellorganellen. Zu diesen gehören insbesondere 70S-Ribosomen als wichtiger Bestandteil der Proteinbiosynthese, Plasmide als Träger zusätzlicher genetischer Informationen (siehe 1.2.2) sowie mit dem Bakterienchromosom als Kernäquivalent der Hauptträger genetischer Informationen (Hof & Dörries, 2009) (Alberts et al., 2011).

1.2.2 Genetische Organisation der Bakterien (Nukleoid)

Träger des Großteils der genetischen Informationen bei Bakterien ist ein ringförmiges und damit in sich geschlossenes DNA-Molekül, das sogenannte Bakterienchromosom. Es liegt dicht zusammengelagert als DNA-Doppelstrang frei im Zytoplasma der Zelle vor ohne von

einer Kernmembran umhüllt zu sein. Der Bereich, in dem diese Erbinformation im Zytoplasma lokalisiert ist, wird Kernäquivalent oder Nukleoid genannt (Campbell et al., 2009). Darüber hinaus liegen 1-3 % der gesamten genetischen Information auf extrachromosomalen Elementen wie Plasmiden. Dabei handelt es sich um zirkuläre Moleküle aus doppelsträngiger DNA. Diese sind zwar für das Überleben der Bakterienzelle entbehrlich, tragen aber teilweise genetische Informationen zu Antibiotikaresistenzen und Toxinproduktionen (Brandis et al., 1994).

1.2.3 Unterschiede zwischen menschlichem und bakteriellem Genom

Im Gegensatz zur kernmembranfreien Lage der Erbinformation in der Bakterienzelle liegt der Großteil des menschlichen genetischen Materials geschützt von einer Membran im Zellkern vor. Auch Histone, basische DNA-Bindeproteine, fehlen dem bakteriellen Chromosom. Das Genom des Menschen ist mit ca. 6×10^9 Basenpaaren und etwa 100.000 – 150.000 Genen um ein Vielfaches umfangreicher als das der Bakterien (ca. 10^6 Basenpaare, entspricht etwa 1000 Genen). Darüber hinaus existieren die bakteriellen Gene, abgesehen von wenigen Ausnahmen, nur singulär. Beim Menschen hingegen kommen einige Gene mehrfach vor, sodass bei Funktionsausfall eines Gens ein Kompensationsmechanismus besteht.

Während sowohl bei Bakterien, als auch bei Menschen Nukleotid-Triplets für je eine Aminosäure kodieren, unterscheidet sich die Ablesetechnik voneinander. Die bei Eukaryoten vorhandenen Introns von genetisch informationslosem Wert fehlen den Prokaryoten. Ein mRNA-Splicing ist daher nicht vonnöten. Auf der Bakterien-DNA befinden sich demnach nur Exons, sodass nahezu das gesamte prokaryote Genom zur Genkodierung bzw. Regulation verwendet wird (Hof & Dörries, 2009).

1.2.4 Bakterien im menschlichen Organismus

Bakterien haben im Organismus des Menschen einen hohen Stellenwert. Auf der einen Seite sind sie als Kommensalen normale Bewohner von Haut und Schleimhäuten. Dabei entspricht die Gesamtheit der Kommensalen der Normalflora (Kayser et al., 1998). So sind Bakterien beispielsweise als Teil der menschlichen Darmflora unabdingbar für einen gesund ablaufenden Verdauungstrakt, indem sie dort die Zersetzung der Nahrung unterstützen, Vitamine produzieren und Fettsäuren herstellen (Brandis et al., 1994). Auf der anderen Seite können Bakterien Auslöser schwerwiegender Infektionen sein. Etwa die Hälfte aller Erkrankungen des Menschen ist auf Bakterien zurückzuführen (Campbell et al., 2009). Dabei

produzieren sie in aller Regel Giftstoffe, die in Exotoxine und Endotoxine zu unterscheiden sind. Während Exotoxine von bestimmten Bakterien aktiv abgesondert und von der Zielzelle aufgenommen werden, sind Endotoxine Bestandteil der Bakterienmembran, die bei Absterben des Bakteriums freigesetzt werden. Durch beide Mechanismen können Krankheiten entstehen, sodass therapeutisch eine Eradikation der verantwortlichen Bakterien nötig wird.

Auch in der forensischen Genetik nimmt der Nachweis von Bakterien einen hohen Stellenwert ein. So ist die Identifikation gewisser Mikroben, unter anderem Bakterien, bei Forensikern zur Datierung des Todeszeitpunkts verwesender Leichen derzeit Gegenstand aktueller Forschung. Insbesondere scheint bei diesen genanalytischen Verfahren eine größere Unabhängigkeit von Fundort und Jahreszeit der menschlichen Überreste gegenüber bisherigen Verfahren zu bestehen (Metcalf et al., 2016).

Der Nachweis von Bakterien ist also sowohl von klinischer, als auch forensischer Relevanz. Das Probenmaterial kann dabei neben Wundabstrichen, Blut, Stuhlproben oder Gelenkflüssigkeit diversen humanen Bereichen entstammen. Zur Identifikation der jeweiligen Bakterienspezies stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Als sogenannte „Kultur“ lassen sich Bakterien beispielsweise auf künstlichen Nährmedien anzüchten und bestimmen. Neben der kulturellen Anzucht gibt es auch die Möglichkeit, die Bakterienspezies mittels Sequenzierung nach vorangegangener Amplifikation spezifischer bakterieller DNA-Abschnitte zu identifizieren.

1.2.5 Untersuchte Bakterienspezies

1.2.5.1 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus aus der Familie der Micrococcaceae zählt zu den grampositiven, nicht sporenbildenden Kugelbakterien von etwa 1 µm Durchmesser. Aufgrund ihrer Unbeweglichkeit lagern sie sich in dichten Haufen oder Trauben zusammen. Staphylococcus aureus kommt beinahe überall in der Natur vor, beim Menschen ist es in 30 % der Fälle als Teil der physiologischen Flora auf der Haut und in den oberen Atemwegen zu finden. Dabei gilt es als eher fakultativ pathogener Mikroorganismus, da bei einem gesunden Menschen mit intaktem Immunsystem in der Regel keine Krankheitserscheinungen zu erwarten sind. Bei schwachem Immunsystem oder anderen für das Bakterium günstigen Bedingungen des Wirts kann es jedoch beispielsweise zur Hautentzündung (Karbunkel, Furunkel),

Muskelerkrankung, Lungenentzündung, Herzmuskelentzündung, Sepsis oder dem toxischen Schocksyndrom (TSS) kommen (Hof & Dörries, 2009). Darüber hinaus gilt dieser Keim als häufiger Erreger einer bakteriellen Arthritis (Hagemann, 2004). Die Pathogenität von *Staphylococcus aureus* (Schutz vor Phagozytose, Bildung von Abszessen, Ausbreitung im Gewebe) zeichnet sich durch seinen Reichtum an Exoenzymen, wie beispielsweise Plasmakoagulase, Hämolysine, DNase, Leukozidin, Hyaluronidase sowie durch das Vorhandensein von zellwandgebundenen Faktoren, wie dem Protein A und dem Clumpingfaktor aus (Brandis et al., 1994).

1.2.5.2 Streptococcus pneumoniae

Der Familie der Streptococcaceae zugehörig ist die Spezies *Streptococcus pneumoniae*. Hierbei handelt es sich um grampositive, ca. 1 µm große Bakterien, die sich paarweise anordnen und daher morphologisch zu den Diplokokken zählen. Zu den bedeutsamsten Virulenzfaktoren dieser Spezies gehört neben dem Hämolysin, welches das Eindringen des Keims über Schleimhäute ermöglicht, vor allem die Polysaccharidkapsel. Diese schützt das Bakterium vor Phagozytose. Pneumokokken können eine ganze Reihe von Infektionen auslösen. Dazu zählen beispielsweise Lungen-, Mittelohr- und Hirnhautentzündungen (Hof & Dörries, 2009).

1.2.5.3 Enterococcus faecium

Enterococcus faecium ist ein grampositiver, meist paarweise angeordneter Erreger aus der Familie der Streptococcaceae. Enterokokken machen beim Menschen bis zu 50% der aeroben Darmflora aus. Pathogene Stämme können bei immungeschwächten Patienten zu einer Reihe von Lokalinfektionen führen. Außerdem ist ein Großteil der Harnwegsinfektionen enterokokkenbedingt (Hof & Dörries, 2009).

1.2.4.4 Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa ist ein gramnegatives, nicht sporenbildendes und dank Geißeln bewegliches Stäbchenbakterium. Als pathogener Keim ist *Pseudomonas aeruginosa* Verursacher des blaugrünen Wundeiters, wie er beispielweise bei postoperativen Wundinfektionen entsteht. Darüberhinaus sind weitere typische Krankheiten wie eine Otitis externa, rezidivierende Harnwegsinfekte oder Infektionen der Respirationsorgane mit diesem Erreger verbunden (Hof & Dörries, 2009).

1.3 Gelenkflüssigkeit (Synovia)

Die Synovia, auch Gelenkschmiere genannt, ist eine viskose, klare und leicht gelbliche Flüssigkeit, die in Gelenken, Schleimbeuteln und Sehnenscheiden enthalten ist (Bommas-Ebert et al., 2006). Ihre Bildung erfolgt durch mesenchymale Bindegewebszellen der Membrana synovialis, die die gefäßreiche Innenhaut der Gelenkkapsel darstellt. Diese sezerniert die Synovialflüssigkeit in den Gelenkspalt (Moll & Moll, 1997). Das Volumen variiert dabei je nach Größe des Gelenks und misst beim größten menschlichen Gelenk, dem Kniegelenk, etwa 3 ml (Berens von Rautenfeld et al., 1994). Der Abfluss der Synovialflüssigkeit geschieht über das lymphatische System (Manger et al., 2005).

1.3.1 Funktion

Synovialflüssigkeit sorgt als Gleitmittel für eine reibungsarme und schmerzfreie Bewegung der am Gelenk beteiligten knöchernen Strukturen (Emminger, 2005). Darüber hinaus versorgt die Gelenkflüssigkeit den gefäßlosen Gelenkknorpel per Diffusion mit Nährstoffen wie Glucose und Aminosäuren. Auch der Abtransport von Knorpelabbauprodukten geschieht mittels der Gelenkflüssigkeit (Berens von Rautenfeld et al., 1994). Synovia und Knorpel zusammen ermöglichen letztendlich eine effektive Abfederung von Druckbelastungen auf das Gelenk (Rohen & Lütjen-Drecoll, 2006).

1.3.2 Zusammensetzung

Die Synovia ist eine mukopolysaccharidhaltige Flüssigkeit. Sie besitzt als Bluttranssudat eine dem Blutplasma ähnliche Elektrolytzusammensetzung und besteht zu einem Großteil aus Wasser. Weitere Bestandteile sind Proteine, Glukose, Muzine und Glycosaminoglycane (Hyaluronsäure), welche für die Viskosität verantwortlich ist. Außerdem sind in geringem Maße auch abgeschilferte Zellen der Membrana synovialis sowie Makrophagen zu finden (Lippert, 2006).

1.3.3 Pathologische Veränderungen

Wichtiger Teilmechanismus zur Versorgung des gefäßfreien Gelenkknorpels ist der Austausch der Synovialflüssigkeit. Dieser geschieht im Rahmen wechselnder Be- und Entlastungen des Gelenks. Demzufolge treten bei extremer Ruhigstellung, aber auch außergewöhnlicher Belastung Knorpelschäden durch Ernährungsstörungen auf. Eine veränderte Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit an sich kann bei pathologischen Gelenkgeschehen präsent werden. Bei nicht-entzündlichen Arthropathien, zum Beispiel bei

Arthrose, ist die Synovialflüssigkeit bernsteinfarben und viskös, ihre Leukozytenzahl mit etwa 200-2000/mm³ gering und der Granulozytenanteil liegt bei unter 25%. Im Rahmen entzündlicher Gelenkprozesse, beispielsweise rheumatoider Arthritis, trübt die Synovialflüssigkeit bei gelblicher Farbe ein und ihre Viskosität nimmt ab. Es zeigt sich regelhaft ein Anstieg der Leukozyten auf ca. 2000 – 75000/mm³ bei einem Anteil der Granulozyten von über 25%. Kommt es zum Beispiel bei einer septischen Arthritis zu einem infektiösen Gelenkgeschehen, liegt die Zahl der Leukozyten bei 50000-100000/mm³ und über 75% sind Granulozyten. Bei sehr trüber und undurchsichtiger Synovialflüssigkeit ist ihre Viskosität stark zurückgegangen (Zeidler et al., 2008). Ein Erregernachweis zur Identifikation entsprechender Bakterien ist indiziert (Kalden et al., 1988).

2. ZIELSETZUNG

Für den molekulargenetischen Nachweis von Bakterien in Körperflüssigkeiten und -biopsien existieren kommerzielle und in der Regel preisintensive sowie zeitaufwändige Nachweiskits, zum Beispiel das GenoType BacIdent Kit der Firma HAIN Lifescience.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer schnellen, unkomplizierten und kostengünstigen Screening-Analyse, um häufig auftretende Bakterienstämme, wie beispielsweise Staphylokokken, Streptokokken oder Enterokokken in humanen Proben nachzuweisen. Hierbei war es außerdem wichtig, das Nachweisverfahren in gängigen forensisch-genetischen Laboren im Rahmen der Laborroutine anwenden zu können, ohne dass die Anschaffung zusätzlicher Geräte oder Hilfsmittel erforderlich wird.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Untersuchte Bakterienspezies

Bei den im Rahmen dieser Arbeit behandelten Bakterien liegt der Fokus auf gängigen klinisch-relevanten grampositiven und gramnegativen Erregern. Für die Humanmedizin wichtige Vertreter der grampositiven Kugelbakterien (Kokken) findet man u.a. in der Familie der Micrococcaceae, mit der prominenten Spezies *Staphylococcus aureus*, sowie in der Familie der Streptococcaceae, auf deren Spezies *Streptococcus pneumoniae* und *Enterococcus faecium* in den Untersuchungen dieser Arbeit ein Fokus liegt. Aus der Familie der gramnegativen Pseudomonadaceae wurde das Hauptaugenmerk auf die medizinisch bedeutungsvolle Spezies *Pseudomonas aeruginosa* gelegt. Die erwähnten Arten erlangen durch ihre Pathogenität und die damit verbundene Fähigkeit der Infektionsauslösung klinische Relevanz. Die Wahl der für die Methodenentwicklung erforderlichen Kontrollproben fiel daher auf diese vier Bakterienspezies.

3.1.2 Probenmaterial

Bei der Auswahl des Probenmaterials bedurfte es einerseits definierter, bakterieller DNA zur Verwendung als Kontrollprobe sowie andererseits eines oder mehrerer Testmedien zur Etablierung und Anwendung der Methode. Hierzu wurden Speichel- und Gelenkflüssigkeitsproben verwendet.

3.1.2.1 Definierte bakterielle DNA als Kontrollprobe

Als Kontrollproben bei der Entwicklung molekulargenetischer Methoden zur Bakterienidentifizierung dienen definierte DNA-Proben der Spezies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* und *Pseudomonas aeruginosa*. Diese wurden beim Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erworben und bei -20°C gelagert. Mit der definierten DNA als Positivkontrolle ist es möglich, das Identifikationsverfahren auf Funktionstüchtigkeit hin zu überprüfen und die resultierende, spezifische Fragmentlänge als Standard zu definieren.

3.1.2.2 Speichelproben

Der Mundraum eines Menschen beherbergt eine große Keimvielfalt. Mehr als 600 Bakterienarten können sich dort ansiedeln (Hof & Dörries, 2009). Im Speichel sind Keimzahlen bis zu 10^9 pro ml möglich (Brandis et al., 1994). Anonymisierte Speichelproben freiwilliger Probanden als wenig invasives, schnell verfügbares und kostengünstiges Probenmaterial wurden daher für die Entwicklung der molekulargenetischen Methode zur bakteriellen Speziesidentifizierung verwendet.

3.1.2.3 Gelenkflüssigkeitsproben

Das Untersuchungsmaterial der Synovia wurde vom Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Kiel) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Gelenkflüssigkeit wurde diesem Forschungsprojekt im Rahmen routinemäßig durchgeführter Gelenkpunktionen mit der Zustimmung der Patienten als anonymisierte Proben überlassen. Insgesamt wurden bei dieser Arbeit 48 Synoviaprobe untersucht.

3.2 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus Speichel und Gelenkflüssigkeit erfolgte zur Vergleichbarkeit von Kosten, Aufwand und Nutzen der jeweiligen Extraktionsmethoden durch zwei manuelle und ein halbautomatisches Verfahren.

3.2.1 Manuelle Extraktion mit dem Invisorb Spin Swab Kit (Stratec)

Die Extraktion von DNA aus Speichelproben erfolgt unter Zuhilfenahme des Invisorb Spin Swab Kits der Firma Stratec. Zunächst wird ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 600 µl Lysispuffer sowie 20 µl Proteinase K befüllt. Nach Zugabe der Speichelprobe wird das Gemisch über Nacht bei 65 °C im Thermoschüttler der Eppendorf AG inkubiert.

Am nächsten Tag wird 300 µl Binding Puffer T zugegeben und anschließend die gesamte Lösung in ein 2,0 ml großes mit einem Filtereinsatz besetztes Reaktionsgefäß gegeben. Das im Folgenden durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen / Minute entstehende Filtrat wird verworfen und der Filtereinsatz mit 700 µl Waschpuffer versehen. Es folgt eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen / Minute, nach der das entstandene Filtrat abermals verworfen wird. Nach einmaliger Wiederholung dieses Vorgangs wird die Probe für 2 Minuten bei 13.000 Umdrehungen / Minute zentrifugiert.

Anschließend wird der Filtereinsatz in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 50 µl eines auf 65 °C vorgewärmten Elutionspuffers hinzugegeben. Es schließt sich nun eine einminütige Inkubation der Probe bei Raumtemperatur an, gefolgt von einer Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen / Minute für ebenfalls eine Minute.

Nach Entfernen des Filtereinsatzes enthält das Filtrat sodann die extrahierte DNA (Stratec, 2013).

3.2.2 Manuelle Extraktion mit dem HAIN Lifescience BacExtract-Kit

Das Extraktionsverfahren des BacExtract-Kits der Firma HAIN Lifescience unterteilt sich in drei Phasen: Einer Lysephase humaner Zellen mit dem Abbau menschlicher DNA schließt sich die Lyse von Bakterienzellen an, gefolgt von der Isolierung der bakteriellen DNA. Dieses Verfahren wurde für Speichelproben verwendet.

In ein 2 ml Reaktionsgefäß wird zunächst 1 ml der Probe pipettiert und 250 µl CM-Puffer (enthält >50% Guanidinhydrochlorid, <2,5% Tris) zugegeben. Tris ist eine Kurzbeschreibung für Trishydroxymethylaminomethan und beschreibt ein primäres Amin mit drei alkoholischen Hydroxygruppen. Diese Substanz wird in der Molekularbiologie standardmäßig als Pufferkomponente für DNA-Lösungen verwendet, da sie auf eine Vielzahl von Enzymen nicht inhibierend wirkt. So besteht der häufig und auch im weiteren Verlauf der hier beschriebenen Extraktionsmethode verwendete TE-Puffer zu einem Teil aus Tris. Der andere Teil wird von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), einem wirkungsstarken Komplexbildner, repräsentiert.

Nach der Pufferzugabe zur Probe folgt eine Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur, der sich eine kurze Abzentrifugation anschließt. Dem Gemisch wird nun 250 µl DB1-Puffer (enthält Puffersubstanz, <5% Magnesiumsalz) und 10 µl M-DNase B (enthält DNase und Puffersubstanz) beigemischt. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Probe bei 13.000 Umdrehungen / Minute für zehn Minuten zentrifugiert. Der entstehende Überstand wird verworfen. Nachfolgend wird der Probe 80 µl RL-Puffer zugegeben (enthält >50% Saccharose, <1% Tris und <1% EDTA) und das Reaktionsgefäß kurz abzentrifugiert. Das Extrakt wird anschließend mit 20 µl BugLysis-Lösung (enthält muralytische Enzyme und Puffersubstanz) angereichert und unter Schütteln (1.000 Umdrehungen / Minute) für 30 Minuten im Thermomixer bei 37 °C inkubiert.

Nach Zugabe von 150 µl RP-Puffer (enthält <2% SDS = Natriumdodecylsulfat, <1% Tris, <1% EDTA und <1% Calciumchlorid) und 20 µl Proteinase K folgt eine zehnminütige Inkubation

unter Schütteln (1.000 Umdrehungen / Minute) im Thermomixer bei 56 °C. Der Probe werden nun nacheinander 250 µl CS-Puffer (enthält >50% Guanidinthiocyanat) und 250 µl AB-Puffer (enthält <80% Isopropanol und 2-10% Tris) zugegeben, jeweils gefolgt von einer kurzen Abzentrifugation.

Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird anschließend in einen Filtereinsatz pipettiert, welcher in einem neuen 2 ml Reaktionsgefäß steckt. Bei geschlossenem Deckel des Filtereinsatzes wird die Probe für 30 Sekunden bei 13.000 Umdrehungen / Minute zentrifugiert. Der danach im Reaktionsgefäß befindliche Überstand wird verworfen und der Filtereinsatz in einem neuen 2 ml Reaktionsgefäß platziert. Dieser Vorgang wird nach Beimischung von 400 µl WB-Puffer (enthält <40% Isopropanol und 2-10% EDTA) wiederholt. Nach Zugabe von 400 µl WS-Puffer (<70% Ethanol) folgt eine dreiminütige Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen / Minute. Anschließend wird der Filtereinsatz in ein 1,5 ml Lösungsgefäß gesteckt und das vorherige Reaktionsgefäß samt Durchlauf verworfen. In den Filtereinsatz pipettiert man im Folgenden 100 µl eines auf 70 °C vorgewärmten ES-Puffers (enthält Puffersubstanz) und lässt die Probe mit geschlossenem Deckel des Filtereinsatzes für eine Minute bei Raumtemperatur inkubieren.

Zum Abschluss wird der Filtereinsatz nach einer einminütigen Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen / Minute aus dem Lösungsgefäß entnommen und verworfen. Die extrahierte DNA befindet sich nun im Lösungsgefäß und wird bei -20 °C gelagert (HAIN Lifescience, 2012).

3.2.3 Halbautomatische DNA-Extraktion auf dem King Fisher Flex (Thermo Scientific)

Die halbautomatische DNA-Extraktion auf dem King Fisher Flex der Firma Thermo Scientific wurde bei Speichel- und Gelenkflüssigkeitsproben angewandt.

Zur Vorbereitung werden 200 µl Lysispuffer HLT und 20 µl Proteinase K zu 200 µl der Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es folgt eine Inkubation für 15 Minuten im auf 65 °C vorgewärmten Thermoschüttler. Nach diesem Vorgang wird das Lysat dem Reaktionsgefäß entnommen und in das entsprechende Well einer Arbeitsplatte überführt, welche mit insgesamt 96 Wells die maximale Anzahl der gleichzeitig möglichen Extraktionen erreicht. In das King Fisher Flex Gerät werden insgesamt fünf Arbeitsplatten eingesetzt. In der ersten Platte befindet sich das Lysat, dem nun 270 µl Magnetic-Bead-Arbeitslösung zugegeben werden, an welche die DNA bindet. Die zweite Arbeitsplatte besteht aus Tips, einer

Trägeroberfläche, mittels derer die an Magnetic-Beads gebundene DNA zwischen den einzelnen Platten transportiert wird. In den Arbeitsplatten drei bis fünf wird das Lysat jeweils einem Waschprozess unterzogen. Dabei werden einmal 800 µl und zweimal 900 µl Waschpuffer (HLT, M, II) verwendet. Die gereinigte DNA wird nun in einem letzten Schritt in einem Niedrigsalzpuffer (100 µl Elutionspuffer) eluiert und zur Aufbewahrung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das nachfolgende Schema (Abb. 1) zeigt den Aufbau der Arbeitsplatten des King Fisher Flex (Thermo Scientific, 2010).

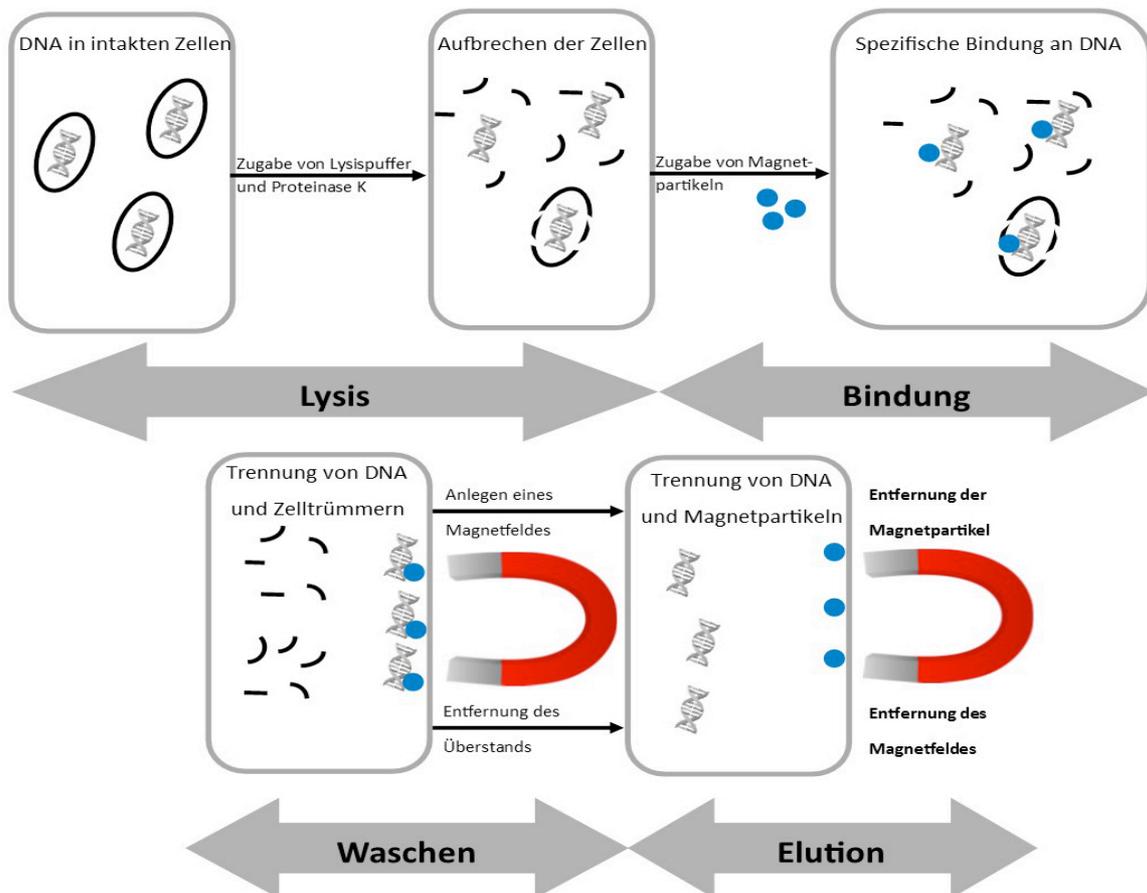


Abb. 1: Halbautomatische DNA-Extraktion auf dem King Fisher Flex (Modrow, 2014). Während der Lyse wird die DNA durch Aufbrechen der Zellen frei. Nach Bindung von Magnetpartikeln an die DNA mit anschließender Anlage eines Magnetfeldes kommt es beim Waschen zur Trennung von DNA und verbliebenen Zelltrümmern. Die abschließende Elution trennt die Magnetpartikel letztlich wieder von der DNA und gibt das DNA-Extrakt frei.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.3.1 Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine wichtige Grundlage für die spätere Identifikation ausgewählter Bakterienspezies. Dieses in vitro-Verfahren schließt sich der DNA-Extraktion an und ermöglicht dank künstlicher Vermehrung geringer DNA-Mengen deren weitere Analyse. Grundsätzlich werden bei dieser Reaktion eine thermostabile DNA-Polymerase, die zu vervielfältigende Template-DNA, passende Oligonukleotid-Primer, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie für den Ablauf der Reaktion geeignete Pufferbedingungen benötigt (Newton & Graham, 1997).

Der gesamte Prozess der Polymerase-Kettenreaktion umfasst 25-30 Zyklen und findet in einem Thermocycler statt. Dieses Gerät ist in der Lage, die innerhalb der jeweiligen Zyklen geforderten Temperaturanpassungen selbstständig durchzuführen. Ein einzelner PCR-Zyklus gliedert sich grob in drei Schritte: Denaturierung, Primerbindung (engl.: Annealing) und Elongation.

Im Denaturierungsschritt wird bei 94 °C die Auftrennung des Template-DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge erreicht. Dadurch ist es den Oligonukleotid-Primern im darauffolgenden Annealingschritt möglich, an die freigelegten Einzelstränge der Template-DNA zu hybridisieren. Die Temperatur bei diesem Schritt wird durch die Länge und die Sequenz der Primer bestimmt und liegt meist bei 50-65 °C. Die Primer sind komplementär zu den Enden der DNA-Matrize und bilden so den Startpunkt für die hitzestabile Taq-Polymerase (Newton & Graham, 1997). Diese verlängert die Oligonukleotide im Elongationsschritt bei 72 °C solange entlang der Template-DNA bis wieder ein Doppelstrang vorliegt (Mülhardt, 2009). Auf diese Weise wird durch jeden Zyklus eine Verdopplung der DNA-Moleküle erreicht. Insgesamt durchläuft die PCR 25-30 dieser Zyklen. Ab dem dritten Zyklus liegen die Amplifikate dann in der exakten Länge der gewünschten Zielregion vor, sodass mit Beginn des vierten Zyklus eine exponentielle Vervielfältigung dieser Zielsequenz einsetzt, bis sie letztendlich millionenfach vermehrt wurde (Newton & Graham, 1997). Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf eines PCR-Zyklus.

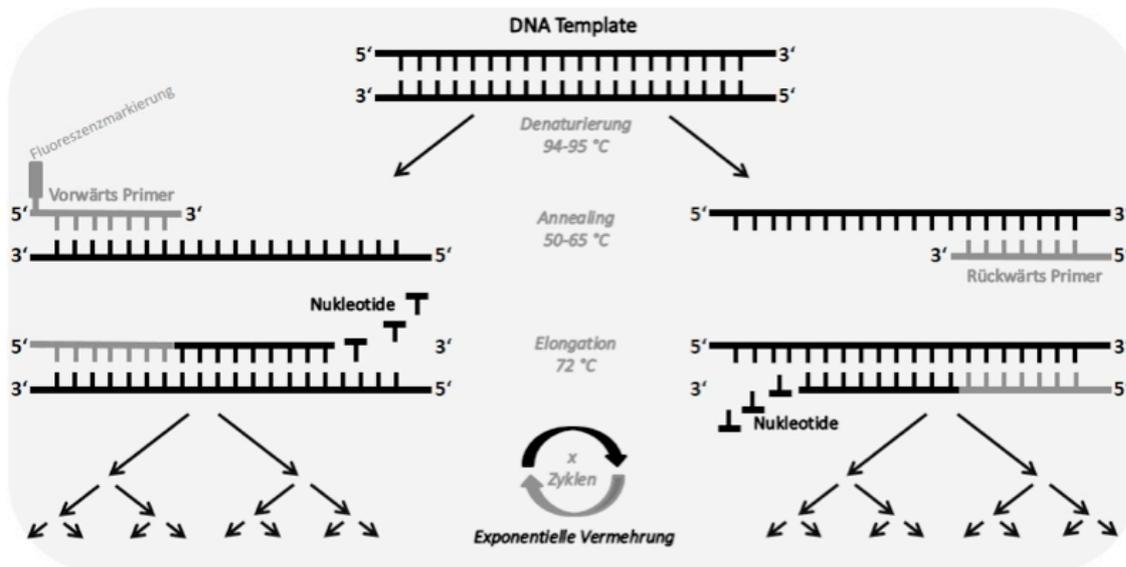


Abb. 2: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus (Modrow, 2011). Die Denaturierungsphase bei 94 °C trennt den DNA-Doppelstrang. Zur Anlage der Primer an die Einzelstränge kommt es in der Annealing-Phase bei 50-65 °C. In der Elongationsphase werden die Primer bei 72 °C verlängert.

3.3.2 „BAC-Screen“ Singleplex-PCR zur Identifikation ausgewählter Bakterienspezies

Bei der in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Screening-PCR „BAC-Screen“ handelt es sich um eine Singleplex-PCR. Diese kennzeichnet sich im Vergleich zu anderen PCR-Techniken, wie beispielweise einer Multiplex-PCR, dadurch, dass nur ein Primerpaar für die Amplifikation eines Genomabschnitts eingesetzt wird. Die Möglichkeit, mittels eines Primerpaars die Erbsubstanz verschiedener Bakterienspezies vervielfältigen und später zuordnen zu können, besteht durch die Eigenschaft des Oligonukleotid-Primerpaars als bakterieller Universalprimer. Dieser bindet im konservativen Bereich der bakteriellen 16S rRNA mittels der Sequenz 5'-GGTGGAGCATGTGGTTTA-3' für den Vorwärtsprimer und der Sequenz 5'-CCATTGTAGCACGTGTGT-3' für den Rückwärtsprimer (Sauer et al., 2005). Die thermostabile Taq-Polymerase synthetisiert nun entlang des 16S rRNA-Template-Einzelstrangs, welcher sich zwischen den verschiedenen Bakterien polymorph zeigt (unterschiedliche Länge des Amplifikats). Auf diese Weise ist mittels Verwendung eines universellen Primerpaars die DNA-Amplifikation verschiedener Bakterien, sowie deren spätere Speziesdifferenzierung möglich.

Im Detail stellt sich der Aufbau der „BAC-Screen“ Singleplex-PCR wie folgt dar:

Das gefriergetrocknete Primermaterial wurde gemäß Herstellerangaben (Biomers) durch Zugabe von 1158 µl TE-Puffer zum Vorwärtsprimer und 234 µl TE-Puffer zum

Rückwärtsprimer als Stammlösung (100 mM) angesetzt. Nach einer 1:10-Verdünnung mit TE-Puffer ist das Primerpaar gebrauchsfertig bzw. kann bei -10 °C aufbewahrt werden. Die Primer sind darüber hinaus von Herstellerseite aus mit dem Farbstoff 6-FAM radioaktiv-fluoreszenzmarkiert, sodass die amplifizierten Genbereiche im weiteren Verlauf der Untersuchung einfacher per Kapillarelektrophorese detektiert werden können.

Ein auf die Anzahl der zu testenden Proben abgestimmter Mastermix wird nun vorab erstellt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Tabelle 1 zeigt dessen Zusammensetzung:

Tab. 1: Zusammensetzung des Mastermix der „BAC-Screen“ Singleplex-PCR.

Komponente	Volumen (µl)
Bidestilliertes Wasser	3,5
Immo-Mix (10x)	12,5
Vorwärtsprimer (10 mM)	2
Rückwärtsprimer (10 mM)	2
<u>Mastermix-Gesamtvolumen / Probe</u>	<u>20 µl</u>
<u>DNA-Template</u>	<u>2 µl</u>

Pro Probe werden nun 20 µl Mastermix und 2 µl DNA-Template in ein Tube des PCR-Reaktionsgefäßes (Stripe) gegeben. Als Negativkontrolle dient ein Reaktionsansatz bestehend aus 20 µl Mastermix und 2 µl destilliertem Wasser. Auf diese Weise wird der PCR-Ansatz kontrolliert. Nach 30-sekündiger Zentrifugation zum Entfernen etwaiger Luftblasen im Reaktionsgefäß werden die Proben im GeneAmp®2700 PCR-Thermoblock platziert. Die „BAC-Screen“ Singleplex-PCR läuft anschließend nach folgendem Temperaturschema ab (Tab. 2). Nach insgesamt 30 Zyklen werden die PCR-Produkte entnommen und zur weiteren Analyse oder zur Aufbewahrung bei -10 °C gegeben.

Tab. 2: Temperaturschema der „BAC-Screen“ Singleplex-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	1 min	30
Primerbindung	53,6 °C	1 min	30
Elongation	72 °C	1 min	30
Finale Elongation	72 °C	7 min	1

3.4 DNA-Qualität und –Quantität

Die Überprüfung von Qualität und Quantität der DNA-Proben erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese Anwendung nutzt die Eigenschaft von Nukleinsäuren, sich innerhalb eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern alle von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode. Je größer dabei das DNA-Fragment ist, desto langsamer bewegt es sich im Spannungsfeld. Dadurch lassen sich bei der späteren Analyse Rückschlüsse auf Größe und Qualität der DNA-Fragmente ziehen (Schrimpf, 2002).

Agarose, ein Polysaccharid aus Meeresalgen, löst sich durch Aufkochen in Wasser bzw. einer entsprechenden Pufferlösung und geliert beim Abkühlen. Die dabei entstehenden Polysaccharidstränge bilden Poren, deren Größe mit Zunahme der Agarosekonzentration abnimmt. Dies hat eine Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente zur Folge. Eine Erhöhung der angelegten Spannung wirkt sich hingegen geschwindigkeitsfördernd aus. Mit Aufhebung der Spannung nach ca. 30-45 Minuten sind die verschiedenen Fragmente unterschiedlich weit im Gel gelaufen und können unter Zuhilfenahme von UV-Licht in einer Dunkelkammer sichtbar gemacht, archiviert und im Anschluss densitometrisch analysiert werden. Im Gel befindliches fluoreszierendes Ethidiumbromid macht durch Interkalation mit der DNA eine Quantitätsbestimmung per Messung der Fluoreszenzintensität möglich (Mülhardt, 2009).

Zur Herstellung eines einprozentigen Gels werden 1 g Agarose, 100 ml 1x TBE-Puffer und 5 µl Ethidiumbromid benötigt. TBE-Puffer ist die Abkürzung für TRIS-Borat-EDTA-Puffer, ein in der Molekularbiologie häufig eingesetzter Puffer bestehend aus

Trishydroxymethylaminomethan (TRIS), Borat (Anion der Borsäure) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA).

Die per Feinwaage abgewogene Agarose wird zusammen mit dem TBE-Puffer in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Nach Aufkochen bei 800 W für 2 Minuten in einer Mikrowelle wird dem Gemisch nach ca. 2-3 Minuten Abkühlung 5 µl Ethidiumbromid zugesetzt und durch leichtes Schwenken gleichmäßig im Erlenmeyerkolben verteilt. Anschließend wird der Inhalt blasenfrei in eine Gelkammer gegossen. Durch das Einstecken eines Kamms in die Gelkammer entstehen im späteren Gel kleine Taschen. Nach 30-45 Minuten ist das Gel auspolymerisiert. Der Kamm kann wieder entfernt und die Gelkammer anschließend mit TBE-Puffer aufgefüllt werden.

Im darauffolgenden Schritt wird zunächst zu jeder 5 µl umfassenden DNA-Probe 5 µl Gelladepuffer gegeben und das Gemisch anschließend in eine Tasche des Gelblocks pipettiert. Das im Gelladepuffer befindliche Bromphenolblau markiert die Lauffront der DNA-Fragmente. Eine Übersicht der Puffer-Zusammensetzungen zeigt Tabelle 3. Zwei Taschen des Gels werden abschließend mit 5 µl einer Leiter (Hyperladder 1 und 4) befüllt. Diese enthält DNA-Fragmente bekannter Größe und Konzentration und dient bei der späteren Auswertung als Standard und Größenvergleich.

Mit Anlegung einer Spannung von 120 V beginnt die ca. 45-minütige Elektrophorese. Die fluoreszierenden DNA-Banden sind anschließend unter UV-Licht im Gel Doc-Gerät der Firma BIO-RAD Laboratories erkennbar und können per gerätebezogener Computersoftware ausgewertet werden.

Tab. 3: Übersicht der Puffer-Zusammensetzungen bei der Agarose-Gelelektrophorese.

Puffer	Zusammensetzung
TBE-Puffer	20 mM EDTA, 890 mM Borsäure, 890 mM Tris-Hydrochlorid, pH 8,3
Gelladepuffer	2,5 g Ficoll 400 zu 10 ml bidestilliertem Wasser, 25 mg Bromphenolblau, 25 mg Kylene Cyanol

3.5 Kapillarelektrophoretische Fragmentanalyse

3.5.1 Prinzip der Kapillarelektrophorese

Die kapillarelektrophoretische Fragmentanalyse dient der Analyse der per PCR amplifizierten DNA-Fragmente, wobei Größe und näherungsweise die Anzahl eines Fragments bestimmt werden können (Newton & Graham, 1997). Es handelt sich dabei um ein analytisches Trennverfahren auf dem Prinzip der Elektrophorese, d.h. geladene Teilchen bewegen sich in einem Medium unter Einfluss eines elektrischen Feldes (Karlson et al., 1994).

Bei der Kapillarelektrophorese erfolgt die Größenauftrennung der DNA-Fragmente in dem elektrischen Feld einer Polymer-gefüllten Kapillare. Die negativ geladenen und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Teilchen wandern von der Kathode zur Anode. Kleine Fragmente benötigen dafür weniger Zeit als große Fragmente und erreichen somit früher einen Laser, der die Fluoreszenz der markierten Fragmente anregt und deren Emissionsmessung über einen CCD-Chip ermöglicht. Zur Größenbestimmung der Fragmente werden sie anschließend unter Zuhilfenahme der Gerätesoftware mit einer Standardreihe, bestehend aus markierten DNA-Fragmenten bekannter Größe, verglichen.

3.5.2 Durchführung

Für diese Arbeit wurde der ABI Prism 3130 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems verwendet. Dieses Gerät verfügt über eine Auftrennstrecke von 36 cm. Als Trennmedium dient das Polymer POP-4.

Zu Beginn wird ein Mastermix bestehend aus 11,7 µl Formamid und 0,3 µl des Größenstandards ILS600 für jede Probe angesetzt. Dieser Formamid-Größenstandard-Mix wird zusammen mit 1 µl PCR-Amplifikat in die 96 Reaktionsgefäße fassende Platte des Geräts pipettiert. Anschließend wird die Platte durch einen Gummiaufsatz verschlossen und bei 1.000 Umdrehungen / Minute für zwei Minuten zentrifugiert. Die Kapillarelektrophorese kann nun nach Einsatz der Platte in den ABI Prism 3130 Genetic Analyzer gestartet werden (Applied Biosystems, 2010). Das Gerät läuft dabei unter folgenden Einstellungen (Tab. 4):

Tab. 4: Übersicht der Geräte-Einstellungen des ABI Prism 3130 Genetic Analyzer bei der Kapillarelektrophorese.

Parameter	Wert
Injektionsvolt	1 kV
Injektionszeit	16-22 Sekunden
Laufvolt	15 kV
Laufzeit	20-50 Minuten
Lauftemperatur	60 °C

3.5.3 Auswertung

Die Auswertung der Kapillarelektrophorese erfolgt unter Zuhilfenahme der GeneMapper-Software, Version 3.2, der Firma Applied Biosystems und einem selbst erstellten Panel- und Bin-Set. Die unterschiedlichen Fragmente werden dabei graphisch in Form von Peaks auf einem Elektropherogramm dargestellt. Abzulesen ist daraus auf der x-Achse die Fragmentlänge in Basenpaaren (bp). Anhand von Fragmenten definierter Länge, die als Größenstandard fungieren, erfolgt ihre Skalierung. Die y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität, gemessen in „relative fluorescent units“ (RFU), welche der gemessenen Emissionsintensität der Fluoreszenzmarkierungen entspricht. Dies ermöglicht eine grobe Quantifizierung der PCR-Produkte. Abbildung 3 zeigt beispielhaft ein solches Elektropherogramm.

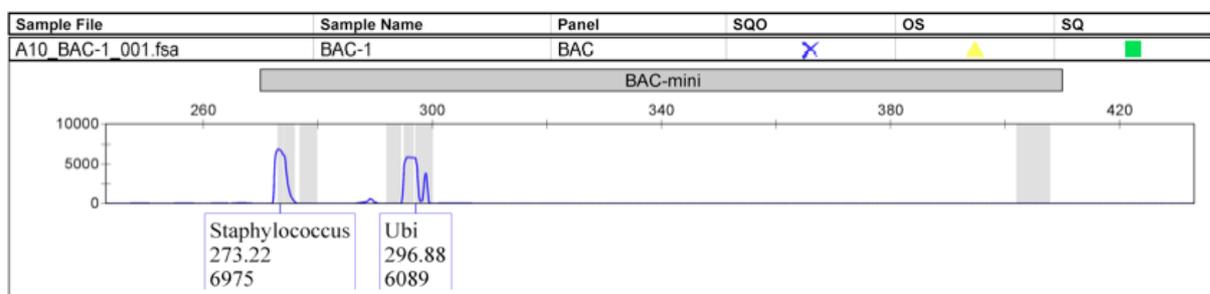


Abb. 3: Beispieldarstellung der Auswertung einer Kapillarelektrophorese mit der GeneMapper-Software. Die blauen Peaks zeigen das Vorhandensein von DNA-Fragmenten an. Die Fragmentlänge (x-Achse) ist unter dem namensgebenden Schriftzug (hier z.B.: Staphylococcus) in Basenpaaren angegeben (hier: 273,22 bp). Die Fluoreszenz (y-Achse) wird in „relative fluorescent units“ (RFU) angegeben und wird in der dritten Zeile unterhalb eines Peaks dargestellt (hier: 6975 RFU).

3.6 Erregerdiagnostik mittels DNA-STRIP-Technologie (GenoType Bac-IDent)

Das GenoType Bac-IDent-Kit der Firma HAIN Lifescience ermöglicht die Diagnostik von 14 klinisch relevanten Bakterien. Als molekulargenetisches Testsystem bedient man sich hierbei der DNA-STRIP-Technologie, bei der DNA nach Isolierung und Amplifizierung aus dem Probenmaterial über eine Hybridisierung und alkalische Phosphatase-Reaktion auf einem Membranstreifen detektiert wird.

Zu Beginn muss die DNA aus dem Probenmaterial isoliert werden. Dies geschah in dieser Arbeit mittels der unter 3.2 erläuterten Extraktionsmethoden. Im Anschluss kommt das GenoType Bac-IDent-Kit zur Anwendung.

Auf die DNA-Isolierung folgt zunächst eine Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern. Hierzu wird ein Mastermix erstellt, der pro Probe 35 µl Primer-Nukleotid-Mix, 10 µl 5-fachen PCR-Puffer sowie 0,7 µl M-Taq enthält. Dieser Mix wird zu je 45 µl in vorbereitete PCR-Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach Zugabe von 5 µl DNA-Probe bzw. einmal 5 µl DNA-freies Wasser als Amplifikations-Negativkontrolle werden die PCR-Reaktionsgefäße in einen Thermocycler überführt. Die Polymerase-Kettenreaktion wird nun mit dem in Tabelle 5 gezeigten Temperaturschema gestartet.

Tab. 5: Temperaturschema der Multiplex-Amplifikation per PCR.

Schritt	Vorgang	Zyklusanzahl
3 min bei 95 °C	Denaturierung	1
30 sec bei 95 °C	Denaturierung	10
2 min bei 58 °C	Primerbindung 1	
25 sec bei 95 °C	Denaturierung	25
40 sec bei 53 °C	Primerbindung 2	
40 sec bei 70 °C	Elongation	
8 min bei 70 °C	Finale Elongation	1

Die bei der DNA-STRIP-Technologie verwendeten Membranstreifen sind mit spezifischen Sonden beschichtet, die komplementär zur selektiv amplifizierten Nukleinsäure sind.

Nach der PCR werden die Amplifikate chemisch denaturiert. Dies ist erforderlich, da die Detektion auf dem Membranstreifen anhand einzelsträngiger DNA erfolgt. Während der nachfolgend beschriebenen Hybridisierung bindet das einzelsträngige Amplifikat spezifisch

an die Sonden auf den Membranstreifen. Anschließend wird es durch eine Konjugat-Reaktion mit dem Enzym alkalische Phosphatase farblich sichtbar gemacht. Nach Anlage einer dem Kit zugehörigen Schablone an die Membranstreifen erfolgt die Bestimmung der mikrobiologischen Erreger.

Zur Hybridisierung wurde das TwinCubator-Gerät der Firma HAIN Lifescience verwendet. Es ermöglicht durch den passgenauen Einsatz einer dem Kit zugehörigen Wanne mit 12 Kavitäten das Erhitzen und Schütteln der darin verwendeten Reagenzien.

Pro Probe werden zunächst 20 µl Denaturierungsreagenz (enthält <2% NaOH, Farbstoff) in die untere Ecke einer Wannenkavität gegeben. Nach Zufügen von 20 µl Amplifikat wird das Gemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Zugabe von jeweils 1 ml Hybridisierungspuffer (enthält 8-10% anionisches Tensid, Farbstoff), der zuvor auf 37-45 °C vorgewärmt wurde. Im Anschluss wird mit einer Pinzette in jede benutzte Kavität der Wanne ein Membranstreifen platziert. Dabei gilt es darauf zu achten, dass dieser vollständig mit Flüssigkeit bedeckt ist. Die Wanne wird nun für 30 Minuten bei 45 °C im TwinCubator unter leichtem Schütteln inkubiert. Die einzelsträngigen DNA-Amplifikate haben nun an die spezifischen Sonden auf dem Membranstreifen gebunden, sodass mit der Entfernung unspezifisch gebundener Amplifikate durch verschiedene Waschschriffe begonnen werden kann. Dazu wird der Hybridisierungspuffer vollständig aus den Kavitäten entfernt und jeweils 1 ml auf 37-45 °C vorgewärmte Stringent-Waschlösung (enthält >25% einer quartären Ammoniumverbindung, <1% anionisches Tensid, Farbstoff) zugegeben. Die Wanne wird nun für 15 Minuten bei 45 °C im TwinCubator inkubiert und die Waschlösung anschließend wieder vollständig aus den Kavitäten entfernt. Die Membranstreifen werden im nächsten Schritt für 1 Minute mit 1 ml Rinse-Lösung (enthält Puffersubstanz, <1% NaCl, <1% anionisches Tensid) unter stetiger Bewegung auf dem TwinCubator-Gerät gewaschen. Die Lösung wird anschließend wieder aus der Wannenkavität entfernt. Nun wird jedem Membranstreifen 1 ml Konjugat-Lösung zugegeben. Die Konjugat-Lösung wurde zuvor durch eine 1:100-Verdünnung von Konjugat-Konzentrat (enthält Streptavidin-konjugierte Alkalische Phosphatase, Farbstoff) und Konjugat-Puffer (enthält Puffersubstanz, 1% Blocking-Reagenz, <1% NaCl) erstellt und auf Raumtemperatur temperiert. Die Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase bindet hierbei über das Streptavidin an das Biotin des Amplifikats, was eine spätere enzymatische Farbreaktion auf den Membranstreifen ermöglicht. Die mit Konjugat-Lösung gefüllte Wanne wird dann für 30 Minuten bei

Raumtemperatur im TwinCubator unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wird jeder Membranstreifen in einer Kavität zweimal je 1 Minute mit 1 ml Rinse-Lösung und einmal mit 1 ml destilliertem Wasser auf dem TwinCubator-Gerät gewaschen. Anschließend ist die Wannenkavität wieder vollständig von Flüssigkeiten zu befreien. Es folgt die Zugabe von 1 ml Substrat-Lösung zu jedem Membranstreifen, was bei Inkubation unter Lichtschutz und ohne Schütteln innerhalb von 3-20 Minuten zum Sichtbarwerden der spezifisch gebundenen Amplifivate auf dem Membranstreifen führt, indem die alkalische Phosphatase das zur Detektion zugegebene Substrat auf dem Membranstreifen in einen Farbstoff umsetzt. Die Zeitspanne der Bandenausprägung variiert dabei in Abhängigkeit der Testbedingungen wie beispielsweise der Raumtemperatur. Die verwendete Substrat-Lösung wurde zuvor durch eine 1:100-Verdünnung von Substrat-Konzentrat (enthält Dimethylsulfoxid, Substratlösung) und Substrat-Puffer (enthält Puffersubstanz, <1% Magnesiumchlorid, <1% NaCl) erstellt und auf Raumtemperatur temperiert. Sobald die Banden deutlich ausgeprägt sind, wird die Substrat-Reaktion durch zweimaliges kurzes Waschen mit destilliertem Wasser beendet. Die Membranstreifen können nun mit einer Pinzette aus den Kavitäten genommen und zwecks Trocknung auf saugfähiges Papier gelegt werden. Abschließend lässt sich durch Anlage der beiliegenden Auswertungsschablone das Testergebnis ablesen (HAIN Lifescience, 2012). Einen Teststreifen mit den 14 detektierbaren Bakterien zeigt beispielhaft Abbildung 4.

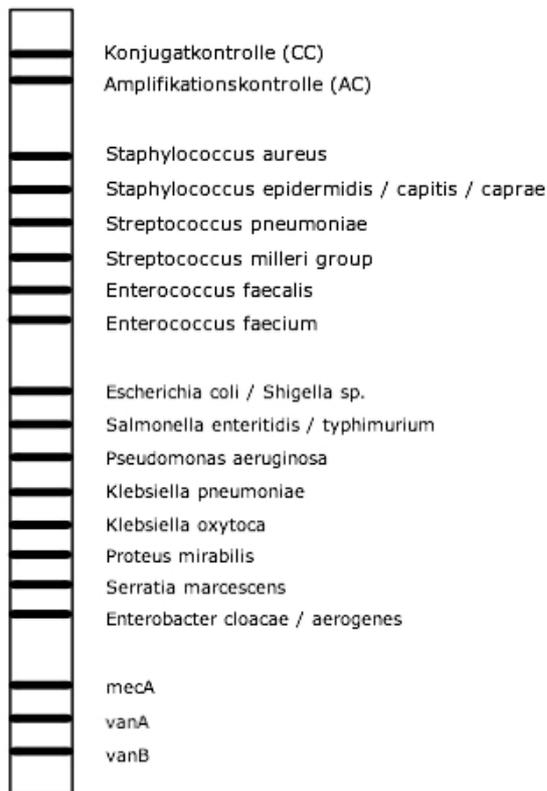


Abb. 4: Schematische Abbildung eines Teststreifens des GenoType Bac-IDent-Kits mit den 14 detektierbaren Bakterien (eigene Darstellung). Die spezifisch gebundenen Amplifikate werden nach Inkubation unter Lichtschutz auf dem Membranstreifen in Form von Banden sichtbar. Durch Anlage einer dem Kit beiliegenden Auswertungsschablone ist die Zuordnung der Banden zu den jeweiligen Bakterienarten möglich.

3.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Fragment. Die um 1975 vom britischen Biochemiker Frederick Sanger entwickelte enzymatische Methode wird auch Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode genannt. Hierbei wird ein radioaktiv oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter DNA-Strang *in vitro* synthetisiert. Didesoxynukleotide sorgen dafür, dass es bei der DNA-Synthese zu einem Kettenabbruch kommt und dadurch unterschiedlich lange DNA-Stränge entstehen.

Als Startpunkt der Neusynthese dient ein sequenzspezifischer Primer. Dieser hybridisiert an das 3'-Ende einer einzelsträngigen DNA-Matrize. In vier parallelen Reaktionen katalysiert im Folgenden eine DNA-Polymerase ausgehend von diesen Primern die Synthese eines komplementären Stranges, wenn alle 4 Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) zugegeben werden (Löffler, 2003). Der Sequenzierungsansatz wird nun in vier gleiche Teile aufgeteilt und in jeden Ansatz eine geringe Menge eines entsprechenden, unterschiedlich

farbmarkierten Didesoxyribonukleosidtriphosphats (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) gegeben. Dadurch kommt es zum sequenzspezifischen Kettenabbruch, weil bei diesem Nukleotid keine freie 3'-OH-Gruppe für die Polymerisierung vorhanden ist. Mit dieser Methode gelangt man zu einem Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Molekülen, an deren 3'-Ende stets eine bestimmte Base zu finden ist. Nachfolgend trennt man den Ansatz in einer Kapillare auf. Die Fluoreszenz von spezifisch markierten Bruchstücken wird durch einen speziellen Laser-Fluorometer vermessen, wodurch die komplementäre Basensequenz unmittelbar abgelesen werden kann (Löffler et al., 2007).

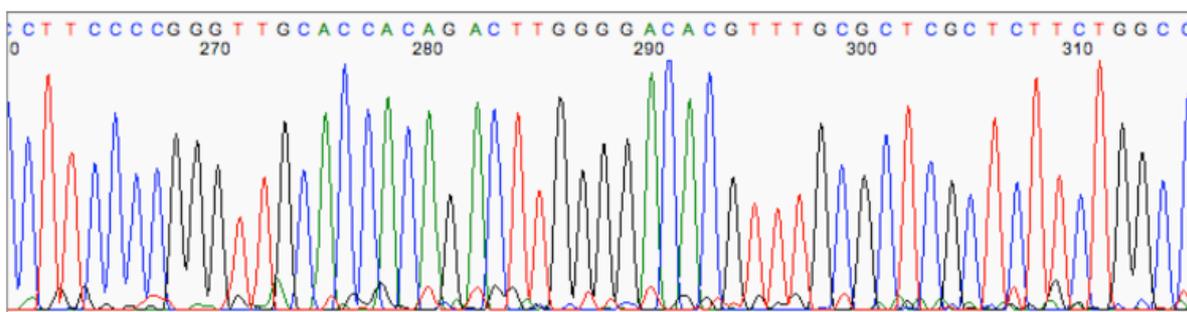


Abb. 5: Ausschnitt eines Elektropherogramms nach DNA-Sequenzierung (Biomedical-Research-Core-Facilities, 2018). Durch Verwendung von Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs), welche jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, besteht die Möglichkeit einer automatisierten DNA-Sequenzierung aller 4 Ansätze in einem Reaktionsgefäß. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung der Kettenabbruchprodukte regt ein Laser diese zur spezifischen Fluoreszenz an. Die Basensequenz des DNA-Strangs lässt sich anschließend durch die Abfolge der im Fluoreszenzphotometer detektierten Farbsignale ablesen.

3.8 Sequenzdatenanalyse mit dem BLAST-Modul

Beim Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) handelt es sich um ein Modul zur Analyse biologischer Sequenzdaten. Hierbei besteht die Möglichkeit, experimentell ermittelte DNA-Sequenzen mit den in der Datenbank gespeicherten Sequenzen abzugleichen und dadurch zuordnen und benennen zu können. BLAST gibt neben den Gegenüberstellungen der jeweiligen DNA-Abschnitte auch deren Treffersignifikanz an.

3.9 Methodik des kulturellen Erregernachweises

Im Labor bedarf es für das Wachstum von Bakterien spezieller biologischer Bedingungen. Diese werden mit der Wahl eines geeigneten Nährmediums geschaffen und bilden die Grundlage für die bakterielle Vermehrung. Grob stehen dabei flüssige (Nährlösungen) und

gelierte Formen (Nährböden) zur Verfügung. Die Wahl des geeigneten Kulturmediums steht dabei nicht zuletzt mit dem gewünschten Anwendungsgebiet in Zusammenhang. Flüssigmedien werden häufig als Anreicherungsform genutzt, wenn beispielsweise größere Mengen einer Kultur vonnöten sind. Festmedien kommen hingegen häufiger zur Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen zur Anwendung (Hahn et al., 2009).

Nährmedien bestehen neben einem Großteil Wasser zu weiteren Teilen aus anorganischen Salzen und insbesondere den von den Bakterien benötigten organischen oder anorganischen Nährstoffen wie etwa Kohlenhydrate, Peptide und Aminosäuren. Gegebenenfalls werden außerdem Hemmstoffe, Puffersubstanzen, Indikatoren oder Wachstumsfaktoren hinzugefügt. Charakteristisch für einen festen Nährboden ist darüber hinaus die Verwendung von einem Geliermittel wie beispielsweise Agar (Kayser et al., 2010).

Nachdem eine Probe entnommen und einem speziellen Nährmedium zugefügt wurde, beginnt für die Bakterien der Vermehrungszyklus. Dieser startet zunächst mit einer Latenzphase (Lag-Phase), in der sich die Bakterien an ihre Umgebung anpassen. Liegt eine genügende Nährstoffzufuhr vor, vermehren sich die Bakterien sodann durch Zweiteilung. So ergibt sich ein exponentielles Wachstum, die sogenannte Wachstumsphase (Log-Phase). Wenn nach einiger Zeit die vorhandenen Nährstoffe aufgebraucht sind, geht die Bakterienkultur in eine stationäre Phase über. Das Bakterienwachstum verringert sich bis zum Erreichen eines Vermehrungsstillstands. Je nach Bakterienart kann sich dieser Wachstumskurve noch eine Sterbephase anschließen. Außerordentlicher Sauerstoffmangel sowie die Behinderung vom Zellstoffwechsel durch angesammelte Toxine können zu einer Reduktion der Zellzahl führen (Hirsch-Kauffmann & Schweiger, 2004).

In Abhängigkeit von der Bakterienart unterscheidet sich dabei die Dauer dieses Vermehrungszyklus. Die auch als Generationszeit bezeichnete Zeitspanne liegt je nach Art etwa zwischen 15 Minuten und 24 Stunden (Bast, 2014).

Nach der Anzucht der Bakterien folgt zur Identifizierung und Analyse eine Differenzierung und Typisierung der Bakterien anhand verschiedener Merkmale. Unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops erfolgt etwa die Einteilung nach morphologischen Kriterien wie Größe, Form oder Anfärbeverhalten. Per Gaschromatographie lassen sich chemische Merkmale wie spezifische Muster kurzkettiger Fettsäuren beispielsweise bei Anaerobiern nachweisen. Pathogenitätsmerkmale, etwa das Vorhandensein von Virulenzfaktoren wie Toxinen, lassen

sich mittels Bioassays oder genetischer Analysen detektieren (Hof & Dörries, 2009). In der Gesamtschau gelingt auf diese Weise der kulturelle Erregernachweis.

4. ERGEBNISSE

4.1 Extraktionsverfahren

Bei den Untersuchungen zu dieser Arbeit kamen drei verschiedene Verfahren zur Extraktion von bakterieller DNA zum Einsatz. Neben dem Extraktionsergebnis mussten wirtschaftliche Aspekte, wie der zeitliche und finanzielle Aufwand der jeweiligen Methoden, verglichen werden.

Zunächst wurden die beiden manuellen Extraktionsverfahren einander gegenübergestellt.

Die manuelle Extraktion bakterieller DNA mit dem Invisorb Spin Swab Kit der Firma Stratec wurde bei zwei Proben durchgeführt. Verwendet wurden Speichelproben von 1000 µl und 600 µl Menge. Die darin enthaltene DNA wurde gemäß der in 3.2.1 geschilderten Vorgehensweise extrahiert.

Dem gegenübergestellt wurde die manuelle Extraktion bakterieller DNA mit dem BacExtract Kit der Firma HAIN Lifescience. Hierbei wurden ebenfalls zwei Speichelproben der Menge 1000 µl und 600 µl verwendet und die darin enthaltene DNA wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben extrahiert.

Anschließend wurde die Menge und die Fragmentlänge der Extrakte mit der in 3.4 erläuterten Agarosegelelektrophorese analysiert. Abbildung 6 zeigt intensivere Banden, für die DNA, die per Spin Swab Kit extrahiert wurde, gegenüber den per BacExtract Kit extrahierten Proben. Beide Verfahren liefern in gleicher Weise kurze homogene DNA-Fragmente von etwa 250-290 bp Länge.

Die Durchführung des Invisorb Spin Swab Kits der Firma Stratec war gegenüber dem BacExtract Kit der Firma HAIN Lifescience in wenigen Schritten umsetzbar. So ermöglicht das Spin Swab Kit nach einmaliger, nächtlicher Inkubation am Folgetag einen im Vergleich rascheren weiteren Arbeitsablauf. Demgegenüber sind im Extraktionsverfahren per BacExtract Kit mehr einzelne Arbeitsschritte und insgesamt sechs Inkubationsphasen von bis zu 15 Minuten Dauer notwendig.

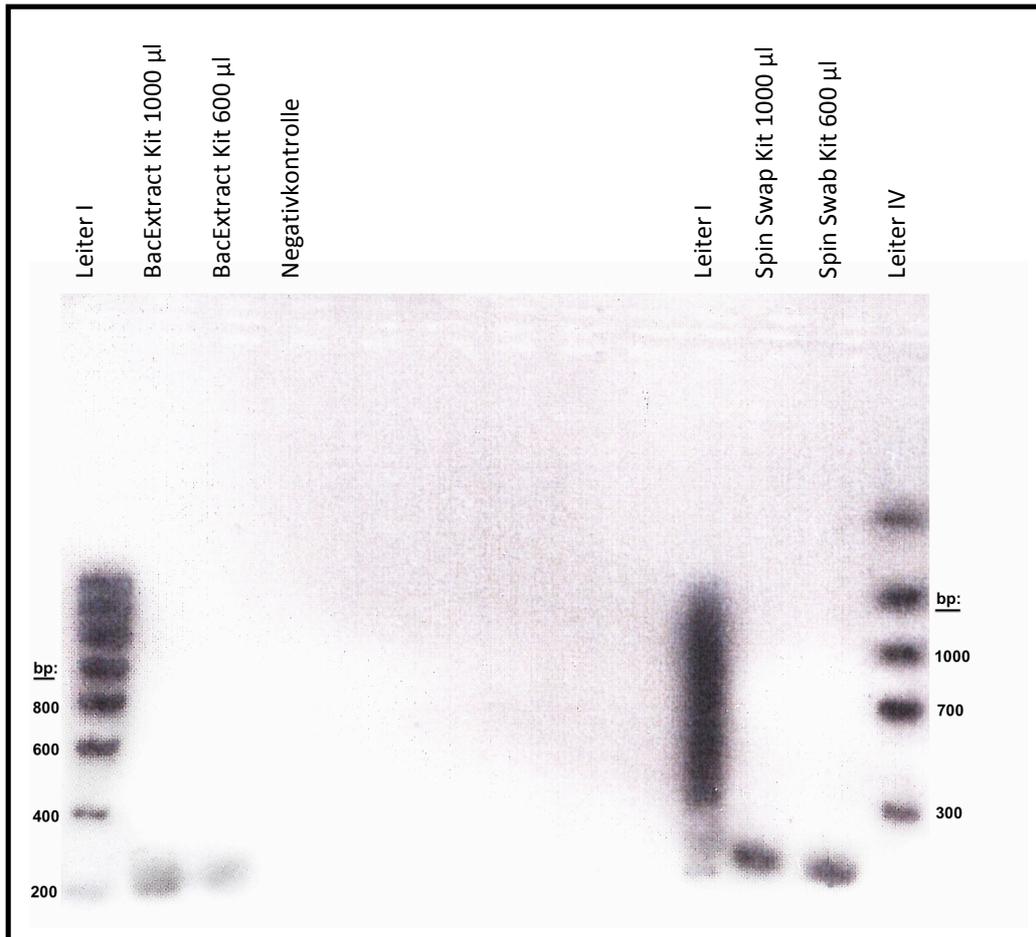


Abb. 6: Agarosegelelektrophorese zum Vergleich der manuellen DNA-Extraktionsverfahren BacExtract (HAIN Lifescience) und Invisorb Spin Swab (Stratec). Leiter I und IV enthalten DNA-Fragmente bekannter Größe und Konzentration und dienen als Standard und Größenvergleich. Sowohl das BacExtract als auch Invisorb Spin Swab Extraktionsverfahren zeigen DNA-Fragmente von etwa 250-290 bp Länge. Die Agarosegelelektrophorese legt eine effektivere DNA-Extraktion des Spin Swab Kits mit intensiveren Banden gegenüber dem BacExtract Kit nahe.

Auf den Vergleich der beiden manuellen Extraktionsverfahren folgte die Gegenüberstellung der präferierten manuellen Extraktionsmethode Invisorb Spin Swab (Stratec) mit der halbautomatischen DNA-Extraktion auf dem King Fisher Flex-Gerät der Firma Thermo Scientific.

Hierzu wurden drei Speichelproben von je 1000 µl Menge mit dem manuellen Extraktionskit Spin Swab gemäß der in 3.2.1 beschriebenen Weise extrahiert. Außerdem erfolgte die DNA-Extraktion von drei Speichelproben mit je 1000 µl Menge per halbautomatischer Technik auf dem King Fisher Flex entsprechend der in 3.2.3 beschriebenen Weise.

Die extrahierte DNA wurde wieder gemäß dem Protokoll in Abschnitt 3.4 in einer Agarosegelelektrophorese analysiert. Im Agarosegelelektrophoresebild der Abbildung 7 ist

erkennbar, dass beide Verfahren vergleichbare DNA Mengen homogener Fragmentlänge von etwa 250-290 bp extrahieren.

Unterschiede konnten in Bezug auf die Wirtschaftlichkeit festgestellt werden. Die Personalbindung ist bei der halbautomatischen Extraktionsmethode deutlich verringert. Während hier die Probenreinigung selbstständig abläuft und nur zur Vorbereitung Waschplatten in das Gerät eingesetzt werden müssen, bedeutet der Waschvorgang bei der manuellen Extraktionsmethode einen vom Personal durchzuführenden Arbeitsschritt.

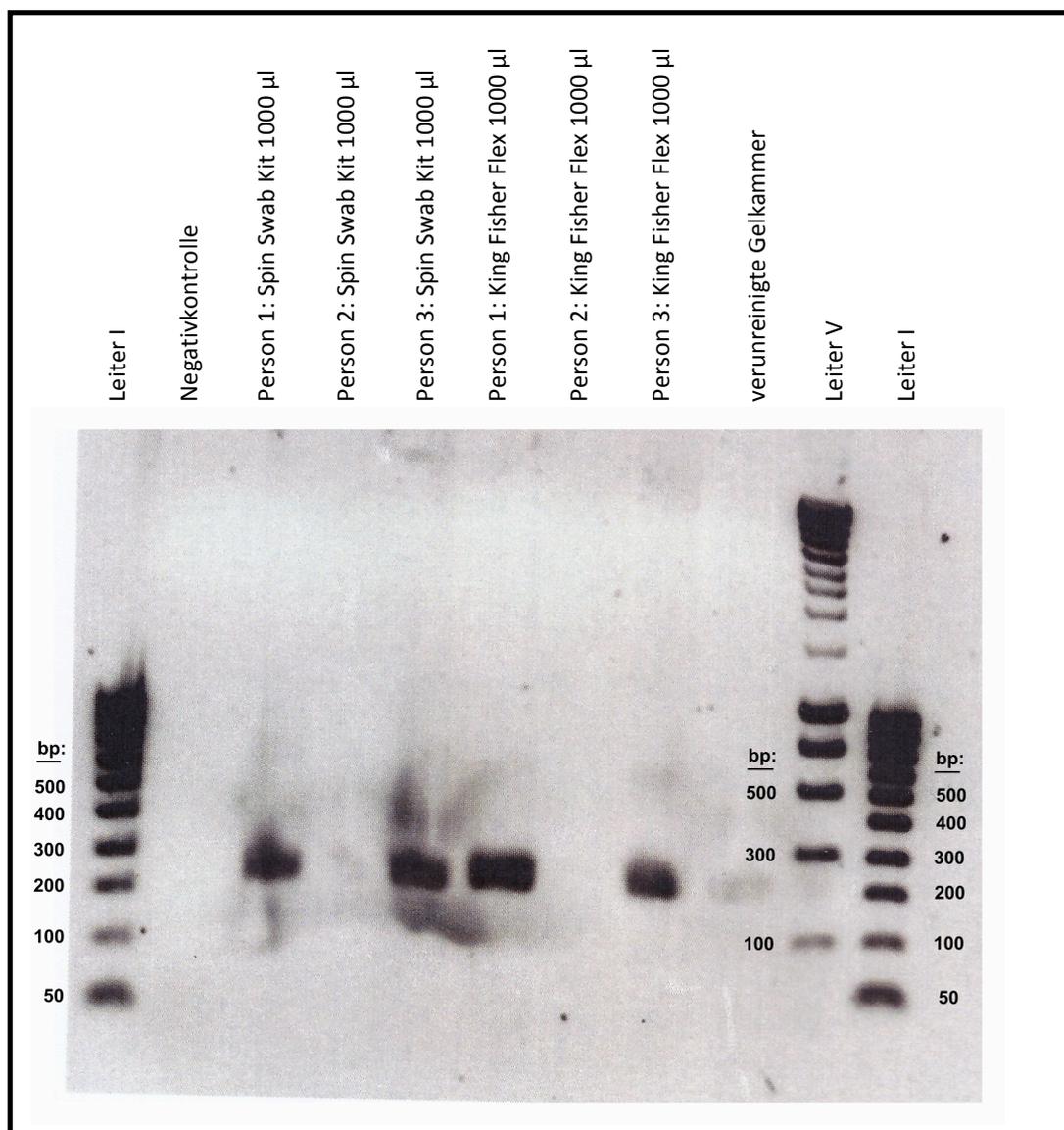


Abb. 7: Agarosegelelektrophorese zum Vergleich des manuellen DNA-Extraktionsverfahrens Invisorb Spin Swab (Stratec) mit dem halbautomatischen DNA-Extraktionsverfahren King Fisher Flex (Thermo Scientific). Es zeigen sich bei beiden Extraktionsverfahren Signalbanden zufriedenstellender Qualität mit einer Fragmentlänge von etwa 250-290 bp.

4.2 Singleplex-PCR Analyse der Bakterienspezies

Die Identifizierung ausgewählter Bakterienspezies erfolgte anhand der Amplifizierung bakterieller Genomabschnitte mittels des in Abschnitt 3.3.2 erläuterten Protokolls der Polymerasekettenreaktion.

4.2.1 Entwicklung und Validierung der Screening-PCR „BAC-Screen“

Ausgewählt wurde ein Primerpaar nach Literaturangaben (Sauer et al, 2005), welches u.a. für die Bakterienarten *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* spezifisch ist. Abbildung 8 zeigt dabei ubiquitäre, bakterielle Sequenzen beginnend mit Nukleotidposition 16014 unter Angabe der ausgewählten Primer, welche rot markiert sind. Die Sequenzen wurden aus DNA erstellt, die unabhängig voneinander in verschiedenen Instituten von verschiedenen Personen entnommen und analysiert wurde. Es ergaben sich nach Anwendung der PCR Fragmente der Größe zwischen 297 und 299 bp. Dabei wurde über die in Abschnitt 3.8 beschriebene Sequenzdatenanalyse mit dem BLAST Modul als Bakterium jeweils *Klebsiella pneumoniae* identifiziert. In den Untersuchungen zu dieser Arbeit waren Amplifikate dieser Fragmentgröße in jeder Probe nachweisbar.

GGTGGAGCATGTGGTTTATATTCTCTGTTCTTTCATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCA
TCAACAACCGCTATGTATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAATACTTGACCACCTG
TAGTACATAAAAAACCCAATCCACATCAAAACCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCCTCAACTAT
CACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACCCACTAGGAACACACGTGCTACAATGG

Beginn: 16014
Basenpaare: 297

GGTGGAGCATGTGGTTTATATTCTCTGTTCTTTCATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGCATTGACTCACCCA
TCAACAACCGCTATGTATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAATACTTGACCACCTG
TAGTACATAAAAAACCCAATCCACATCAAAACCCCTCCCCATGCTTACAAGTAAGTACAGCAATCAACCCTCAACTATC
ACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATAACACACGTGCTACAATGG

Beginn: 16014
Basenpaare: 299

Abb. 8: Ubiquitäre, bakterielle Sequenzen beginnend mit Nukleotidposition 16014 unter Angabe der ausgewählten Primer (rot markiert). Aus der PCR resultieren spezifische Fragmente der Größe zwischen 297 und 299 bp, deren BLAST-Analyse ergab, dass die Sequenz für das Bakterium *Klebsiella pneumoniae* spezifisch ist.

Die ubiquitäre Primersequenz ergab PCR-Produkte von 270 bis 405bp für die verschiedenen Bakterienspezies. Einen Überblick über die in dieser Studie gefundenen Amplifikate gibt Tabelle 6.

Tab. 6: Übersicht über die in dieser Studie gefundenen Amplifikate nach ubiquitärem Primereinsatz. Die Untersuchungen ergaben folgende sieben Bakterienspezies samt ihrer spezifischen Fragmentgröße in Basenpaaren.

Fragmentgröße (bp)	Spezies	Bemerkung
272 - 274	Staphylococcus spec.	
274 - 276	Streptococcus spec.	
277 - 278	Enterococcus faecium	
292 - 294	Pseudomonas spec.	
294 - 296	Enterobacter cloacae	
297 - 299	Klebsiella pneumoniae	Ubiquitär in allen Proben
402 - 405	Sphingomonas spec.	

Im Rahmen der Validierung der entwickelten Screening-PCR „BAC-Screen“ wurde diese bei definierten Bakterienstämmen angewandt. Diese wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Im Einzelnen wurden *Staphylococcus aureus* (DSM30501), *Streptococcus pneumoniae* (DSM11866), *Enterococcus faecium* (DSM20477) und *Pseudomonas aeruginosa* (DSM50071) untersucht.

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf 1-%igen Agarosegelen aufgetrennt und lieferten dabei als Positivkontrolle den Nachweis der Funktionstüchtigkeit der entwickelten PCR (Abschnitt 3.4). Abbildung 9 zeigt eine Verdünnungsreihe der DSM30501-Probe (*Staphylococcus aureus*) nach Elektrophorese auf einem 1-%igen Agarosegel. Es wird eine niedrige Nachweisgrenze bei insgesamt klaren, sauberen Banden der richtigen Fragmentlänge deutlich.

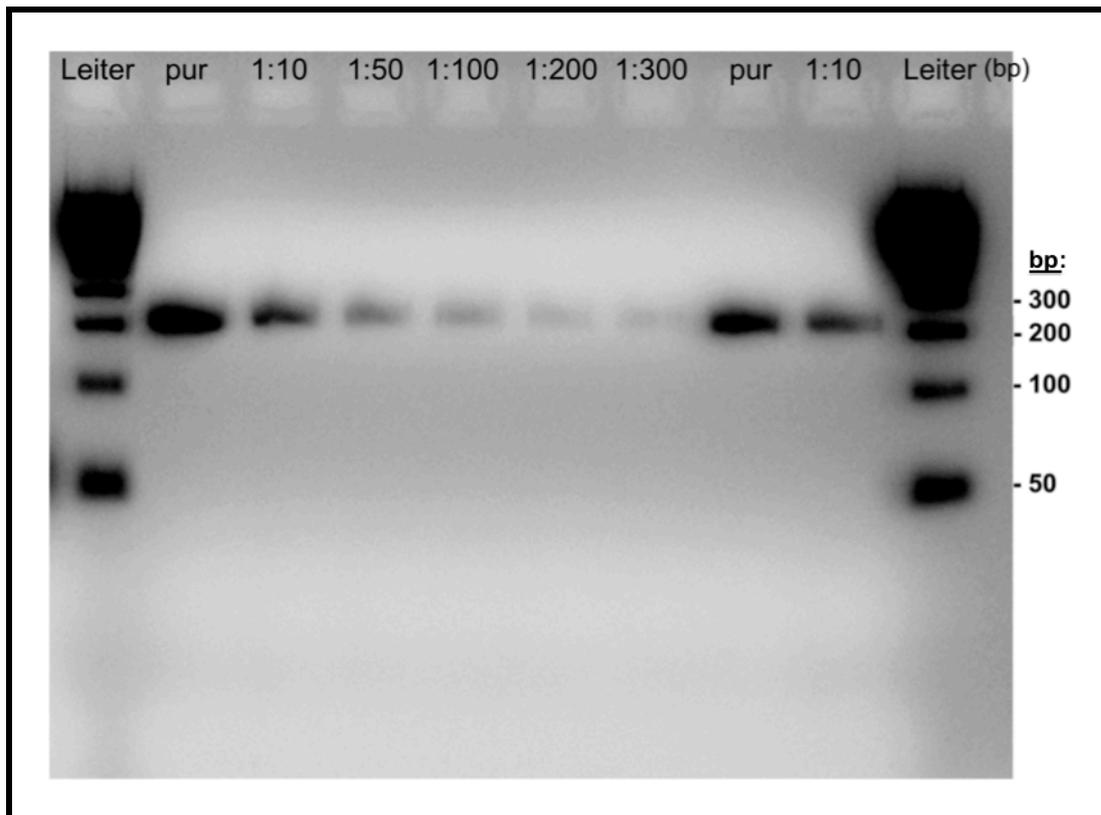


Abb. 9: Verdünnungsreihe einer gekauften DNA-Probe des Bakteriums *Staphylococcus aureus* (DSM30501) nach Elektrophorese auf einem 1-%igen Agarosegel. Die Screening-PCR „BAC-Screen“ funktioniert bei Anwendung mit definierter Bakterien-DNA. Es zeigt sich eine niedrige Nachweisgrenze bei sehr sauberen Signalen. Die Fragmentlänge der Signalbanden beträgt etwa 250-290 bp.

Im Anschluss erfolgte die Anwendung der Screening-PCR zur weiteren Validierung bei Speichelproben von Mitarbeitern. Dazu wurde die im Speichel enthaltene DNA gemäß der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Methode extrahiert. Die darauffolgende Durchführung der PCR ergab ebenfalls positive Nachweise bakterieller DNA. Eine Verdünnungsreihe der DNA einer Mitarbeiterspeichelprobe nach Elektrophorese auf einem 1-%igen Agarosegel ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Screening-PCR liefert DNA-Produkte mit einer Fragmentlänge zwischen ca. 297 – 299 bp von dem ubiquitären Bakterium *Klebsiella pneumoniae*.

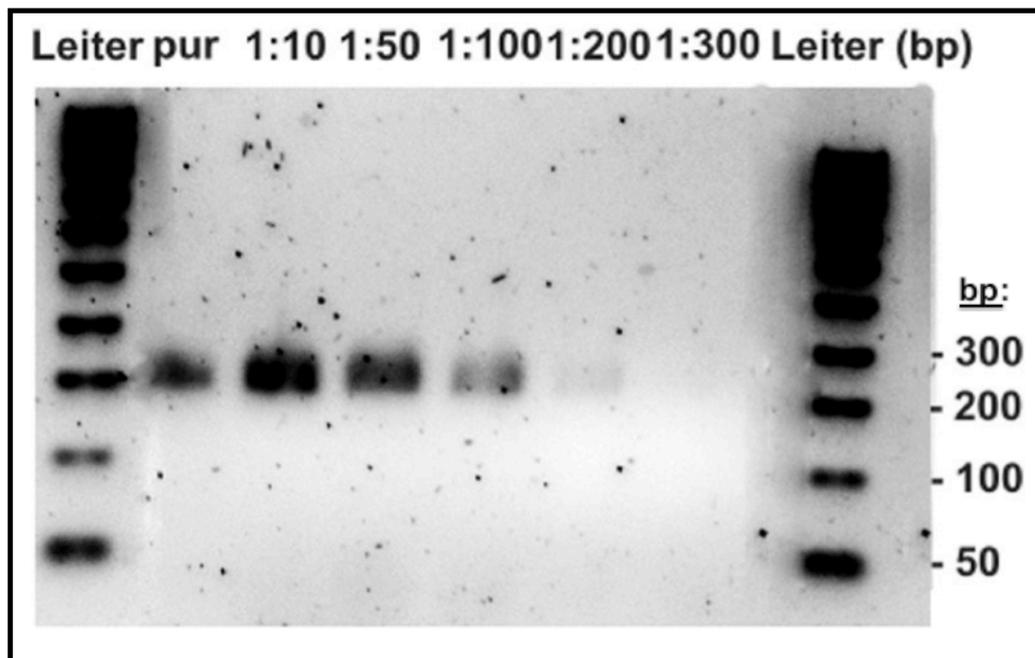


Abb. 10: Verdünnungsreihe der DNA einer Mitarbeiterspeichelprobe nach Elektrophorese auf einem 1-%igen Agarosegel. Es zeigt sich ein positiver Nachweis bakterieller DNA mit Fragmentlängen von ca. 250-290 bp Größe.

4.2.2 Identifikation ausgewählter Bakterienspezies

Die weitere Analyse der Produkte dieser Screening-PCR erfolgte mittels Kapillarelektrophorese auf einem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems (Protokoll Abschnitt 3.5). Die spezifischen PCR-Amplifikate wurden ihrer Größe und relativen Menge nach dargestellt.

Dabei ergaben sich für die bakterienspezifischen Fragmente der gekauften DNA-Proben von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* und *Pseudomonas aeruginosa* nach der Kapillarelektrophorese jeweils spezifische Fragmentlängen (siehe Tabelle 6). Anhand dieser sind die Produkte der Screening-PCR „BAC-Screen“ den jeweiligen Bakterienspezies zuzuordnen. Die Fragmentlänge von 297-299 Basenpaaren kam dabei in jeder Probe vor. Die Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen zum Nachweis von bakterienspezifischen DNA-Fragmenten aus den als Positivkontrollen gekauften DNA-Proben der DSMZ sind in Abbildung 11 aufgeführt. Zu sehen sind die jeweiligen PCR-Produkte bei einem Einsatz von 5ng DNA.

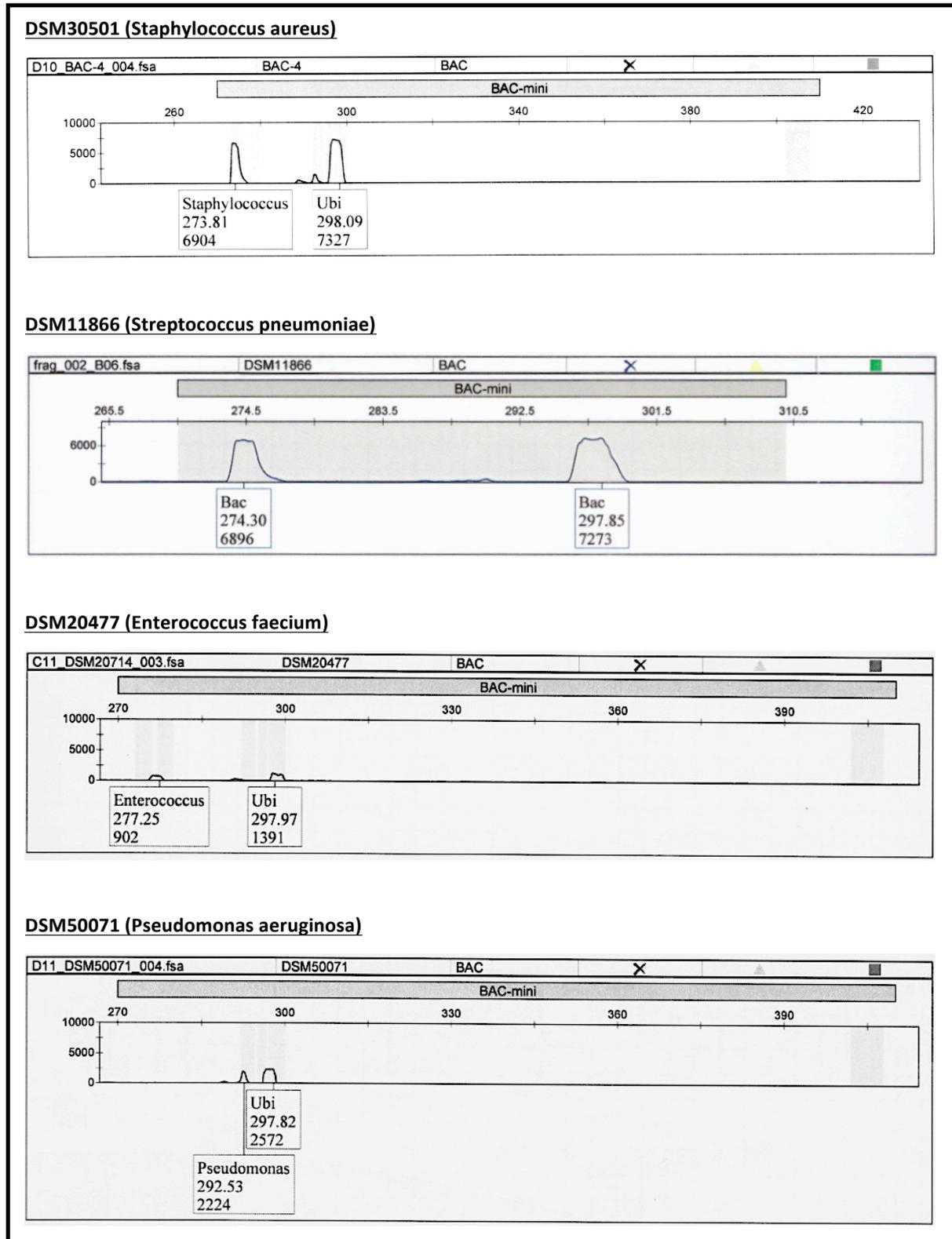


Abb. 11: Nachweis von 6-FAM-markierten bakterienspezifischen Fragmenten nach Kapillarelektrophorese auf einem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer. Zu erkennen sind die spezifischen Produkte der Bakterien *Staphylococcus spec.*, *Streptococcus spec.*, *Enterococcus faecium* und *Pseudomonas aeruginosa* bei einem Einsatz von 5ng DNA der gekauften DSM-Proben.

Im folgenden Abschnitt sind die Testergebnisse der etablierten Screening-PCR nach Anwendung an humanen Speichelproben aufgeführt.

Insgesamt wurden DNA-Extrakte aus sechs Mitarbeiterspeichelproben untersucht. Die darin nachgewiesenen Bakterien sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die jeweiligen Elektropherogramme sind dem Anhang zu entnehmen. Beispielhaft ist hier die kapillarelektrophoretische Analyse der Speichelprobe „JHM(blau)“ in Abbildung 12 dargestellt.

Tab. 7: Testergebnisse der Screening-PCR nach Anwendung an humanen Speichelproben. Die Übersicht zeigt die mittels Screening-PCR in insgesamt sechs Mitarbeiterspeichelproben identifizierten Bakterien. Angegeben sind die kapillarelektrophoretischen Kernangaben der Fragmentlänge in Basenpaaren sowie die in „relative fluorescent units“ (RFU) gemessene Emissionsintensität der Fluoreszenzmarkierung zur groben Quantifizierung der PCR-Produkte.

Fragment- Größe (bp)	Spezies	Speichelproben mit exakter Fragmentgröße (bp) und Peakhöhe (RFU)
272 - 274	Staphylococcus spec.	Bac-VH: 273,79 bp; Peakhöhe: 6498 RFU
274 - 276	Streptococcus spec.	JHM(blau): 274,76 bp; Peakhöhe: 6226 RFU SpSw_MK: 274,84 bp; Peakhöhe: 1725 RFU Li: 274,84 bp; Peakhöhe: 6895 RFU VH: 274,31 bp; Peakhöhe: 6878 RFU
292 - 294	Pseudomonas spec.	JHM(blau): 293,43 bp; Peakhöhe: 2790 RFU SpSw_MK: 293,21 bp; Peakhöhe: 422 RFU VH: 293,08 bp; Peakhöhe: 1855 RFU
294 - 296	Enterobacter cloacae	VH: 296,50 bp; Peakhöhe: 2955 RFU
297 - 299	Ubiquitär (Klebsiella pneumoniae)	JHM(blau): 298,44 bp; Peakhöhe: 954 RFU Li: 297,83 bp; Peakhöhe: 7035 RFU SpSw_MK: 269,99 bp; Peakhöhe: 6603 RFU VH: 297,79 bp; Peakhöhe: 2957 RFU

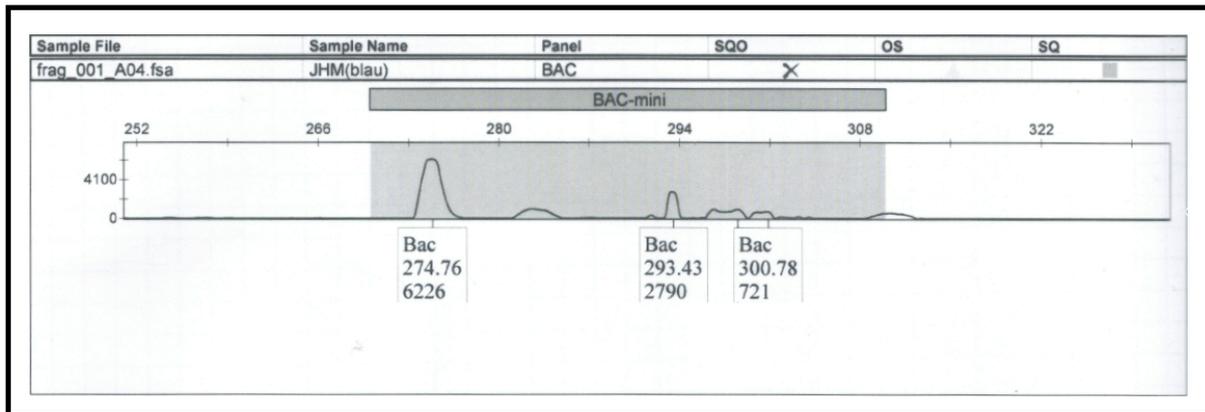


Abb. 12: Elektropherogramm der Mitarbeiterspeichelprobe „JHM(blau)“. Es zeigen sich drei spezifische Peaks verschiedener Fragmentlängen, die auf das Vorhandensein der Bakterien *Streptococcus spec.* (274,76 bp), *Pseudomonas spec.* (293,43 bp) und *Klebsiella pneumoniae* (298,44 bp) schließen lassen.

4.2.3 Identifikation ausgewählter Bakterienspezies in Synovia

Im Folgenden sind die Testergebnisse der etablierten Screening-PCR nach Anwendung auf humanen Gelenkflüssigkeitsproben dargestellt.

Insgesamt wurde die DNA von 48 Gelenkflüssigkeitsproben mittels der in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen halbautomatischen Methode auf dem King Fisher Flex extrahiert und anschließend der bakteriellen Screening-PCR zugeführt. Dabei konnte in drei Fällen bakterielle DNA nachgewiesen werden. Die Analyse der PCR-Produkte dieser drei Gelenkflüssigkeitsproben auf einem 1-%iges Agarosegel zeigt Abbildung 13. Die Signalintensität nimmt dabei von der Probe B4 über die Probe F1 bis hin zur Probe F6 merklich zu und veranschaulicht den positiven Nachweis bakterieller DNA in diesen Synoviaprobe. Die Negativkontrolle, bestehend aus destilliertem Wasser, zeigt im Vergleich dazu kein Signal.

In den übrigen 45 Proben der zur Verfügung stehenden Gelenkflüssigkeiten konnte keine bakterielle DNA nachgewiesen werden.

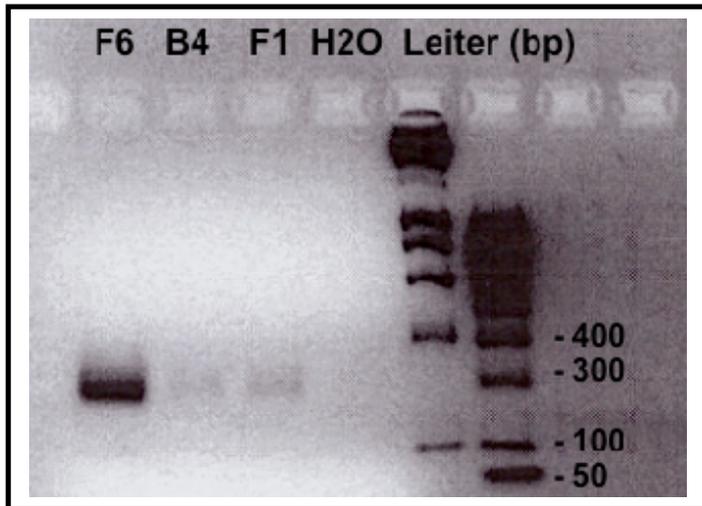


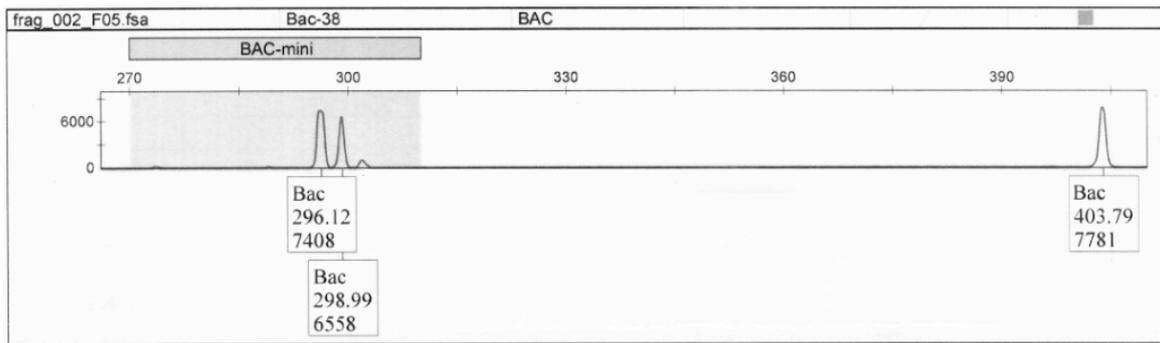
Abb. 13: Agarosegelelektrophorese von drei Gelenkflüssigkeitsproben F6, B4 und F1 nach Durchführung der bakteriellen Screening-PCR. Zu erkennen sind Banden unterschiedlicher Intensität, die mit Fragmentlängen zwischen ca. 250-400 bp das Vorhandensein bakterieller DNA in den Proben nachweisen.

Anschließend wurde die genaue Fragmentlänge der PCR-Amplifikate mittels ABI Prism 3130 bestimmt. Die kapillarelektrophoretische Analyse der spezifischen Amplifikate der drei Synoviaprobe F6, B4 und F1 ihrer Größe und relativen Menge nach ist in Abbildung 14 gezeigt.

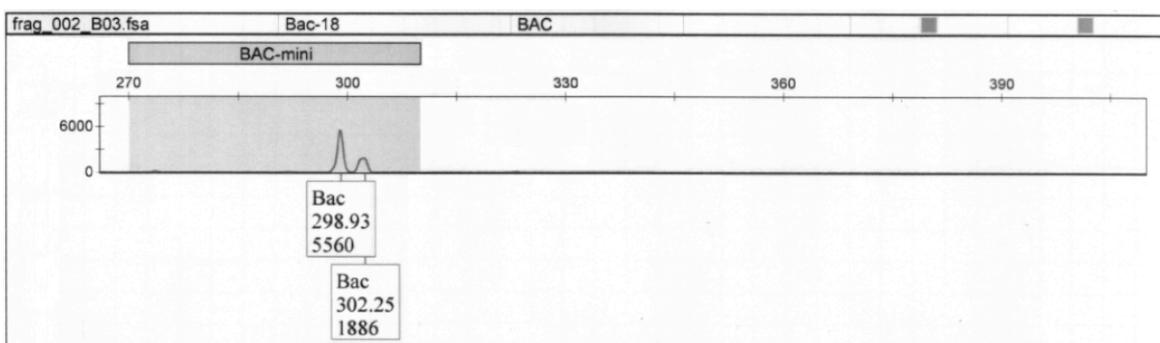
In der Probe F6 konnten neben dem ubiquitären Fragment von ca. 298 bp die spezifischen Produkte der Bakterien *Enterobacter cloacae* (296 bp) und *Sphingomonas* (403 bp) nachgewiesen werden. Die Sequenzdatenanalyse dieser Probe ist in Abschnitt 4.3 „Ergebnisvalidierung mittels BLAST Modul“ aufgeführt. Die Nachüberprüfung mittels des kommerziellen Identifikationskits GenoType Bac-IDent ist in Abschnitt 4.4 zu finden.

Die per Screening-PCR detektierten bakteriellen Anteile der Synoviaprobe B4 und F1 umfassten neben dem ubiquitären Fragment von ca. 298 bp Größe jeweils einen Peak von 302 bp Größe. Das Fragment war keiner Bakterienspezies zuzuordnen.

Synoviaprobe F6



Synoviaprobe B4



Synoviaprobe F1

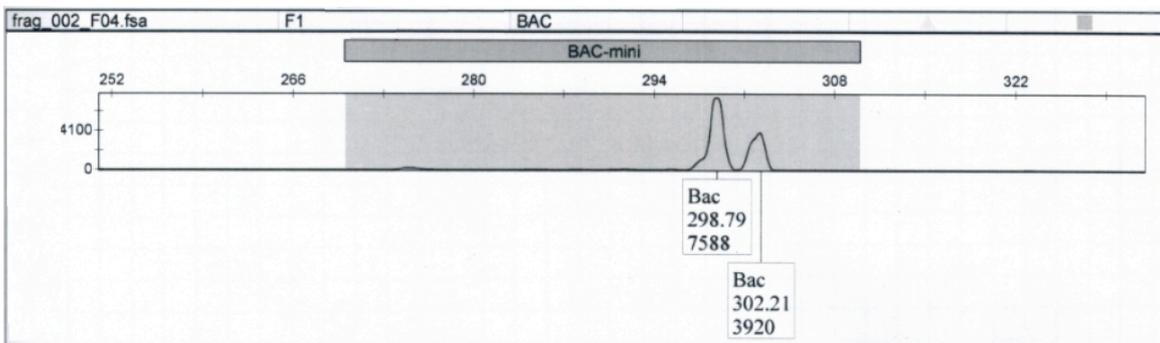


Abb. 14: Nachweis von bakterienspezifischen Fragmenten aus den Gelenkflüssigkeitsproben F6, B4 und F1 nach Kapillarelektrophorese auf einem ABIPrism 3130. Es zeigen sich die spezifischen Produkte der Bakterien *Klebsiella pneumoniae* (298 bp), *Enterobacter cloacae* (296 bp) und *Sphingomonas spec.* (403 bp). Die Peaks der Größe 302 bp konnten nicht zugeordnet werden.

4.3 Ergebnisvalidierung mittels BLAST Modul

Zur Ergebnisvalidierung der Screening-PCR erfolgte eine gemäß Abschnitt 3.7 durchgeführte DNA-Sequenzierung sowie anschließende Analyse mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Die DNA-Sequenzierung wurde mit den beiden gekauften definierten Bakterienproben DSM30501 (*Staphylococcus aureus*) und DSM11866 (*Streptococcus pneumoniae*) sowie zwei verschiedenen Fragmenten der Synoviaprobe F6 bei insgesamt vier Proben durchgeführt.

In allen sequenzierten Proben konnten mittels des in Abschnitt 3.8 geschilderten BLAST Algorithmus die über die Screening-PCR festgestellten Bakterien identifiziert werden.

Das Ergebnis der Sequenzierung der DNA-Probe des Bakteriums *Staphylococcus aureus* (DSM30501) ist stellvertretend in Abbildung 15 aufgeführt. Der Abgleich dieser Sequenz mit der Datenbank des BLAST Moduls bestätigten die in der Screening-PCR festgestellten Fragmente als dem Bakterium *Staphylococcus aureus* zugehörig (Abbildung 16).

Sowohl die DNA-Sequenzierung, als auch die Datenanalyse zur gekauften Probe DSM11866 (*Streptococcus pneumoniae*) ist dem Anhang zu entnehmen.

Die Sequenzdatenanalyse zweier Fragmente der Synoviaprobe F6 bestätigte neben dem ubiquitären Erscheinen von *Klebsiella pneumoniae* (siehe Anhang) das Vorhandensein des Bakteriums *Sphingomonas* (Abbildung 17).

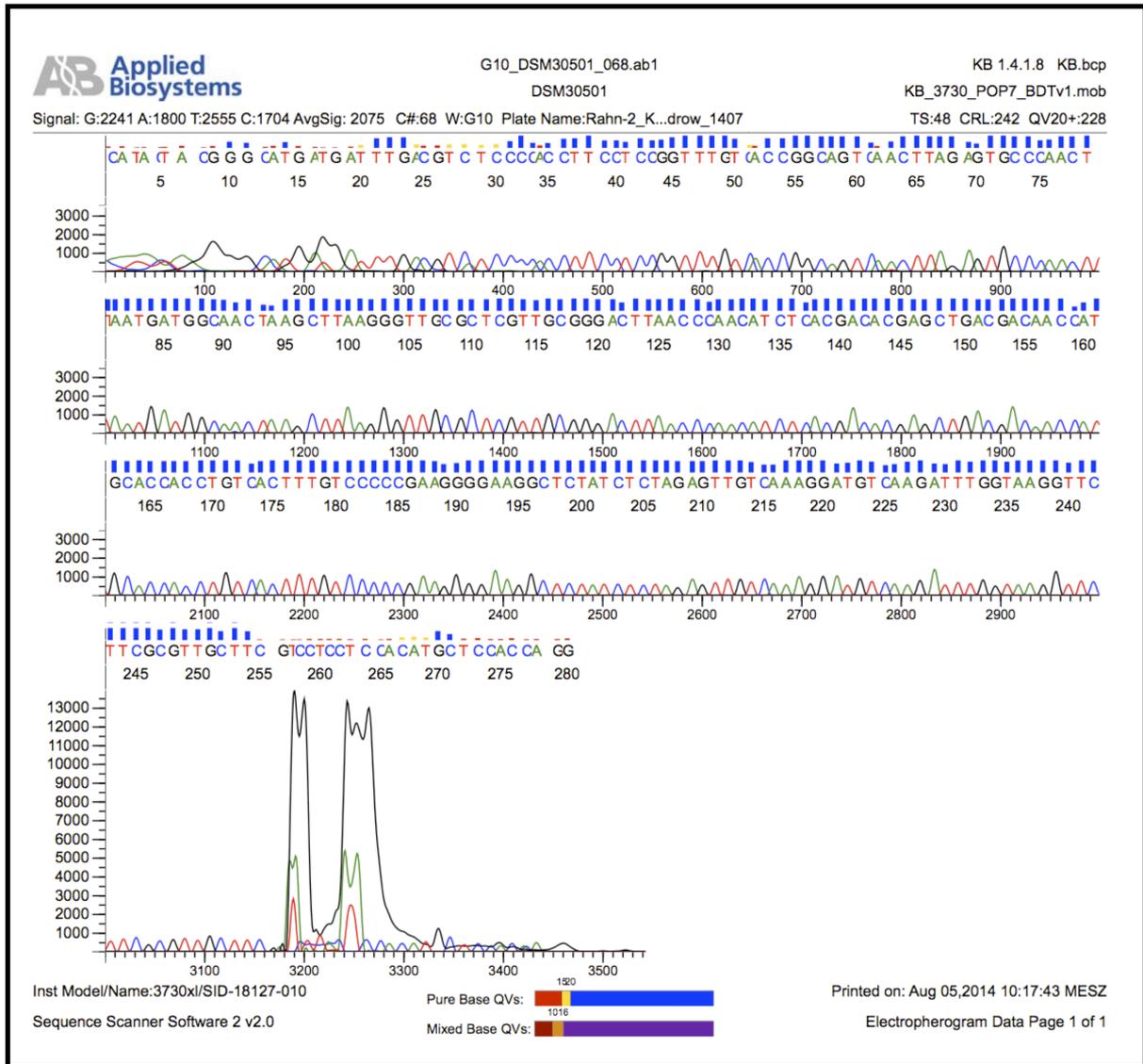


Abb. 15: Sequenzierungsergebnis der gekauften DNA-Probe des Bakteriums *Staphylococcus aureus* (DSM30501). Es lässt sich eine für das Bakterium spezifische Sequenz ablesen.

Staphylococcus aureus subsp. aureus strain AMRF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: **gb|KF999668.1** Length: 1540 Number of Matches: 1
 Range 1: 964 to 1211

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
451 bits(244)	1e-123()	247/248(99%)	1/248(0%)	Plus/Minus	
Features:					
Query	9	GGGCATGATGATTTGACGTC-TCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTA			67
Sbjct	1211	GGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTA			1152
Query	68	GAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC			127
Sbjct	1151	GAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC			1092
Query	128	CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCCGA			187
Sbjct	1091	CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCCGA			1032
Query	188	AGGGGAAGGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGC			247
Sbjct	1031	AGGGGAAGGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGC			972
Query	248	GTTGCTTC 255			
Sbjct	971	GTTGCTTC 964			

Abb. 16: Sequenzdatenanalyse der gekauften DNA-Probe des Bakteriums Staphylococcus aureus (DSM30501) mit dem BLAST Modul. Mit einer Treffersignifikanz von 99% (Identities 247/248 ; 99%) wird die per Screening-PCR experimentell ermittelte DNA-Sequenz als dem Staphylococcus aureus zugehörig identifiziert.

Sphingomonas sp. B26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: **gb|AF128870.1** Length: 1407 Number of Matches: 1
 Range 1: 851 to 1052

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
331 bits(179)	2e-87()	196/204(96%)	2/204(0%)	Plus/Minus	
Features:					
Query	1	CAACTAAATGATGGTAACTAAAGGCGAGGGTTGCGGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA			60
Sbjct	1052	CAACTAAATGATGGTAACTAAAGGCGAGGGTTGCG-CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA			994
Query	61	TCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCAGTCCCCGAAGGGAAA			120
Sbjct	993	TCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCAGTCCCCGAAGGGAAAG			934
Query	121	AGATCCATCTCTGGAAATCGTCCGGACATGTCAAACGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCT			180
Sbjct	933	AGATCCATCTCTGGAAATCGTCCGGACATGTCAAACGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCT			874
Query	181	TGAAAGTGAACGCAGGTGCTCCAC 204			
Sbjct	873	TCAAATTAAAC-CACATGCTCCAC 851			

Abb. 17: Sequenzdatenanalyse der Gelenkflüssigkeitsprobe F6 mit dem BLAST Modul. Mit einer Treffersignifikanz von 96% (Identities 196/204 ; 96%) wird die per Screening-PCR experimentell ermittelte DNA-Sequenz als dem Sphingomonas zugehörig identifiziert.

4.4 Das GenoType Bac-IDent Kit

Die erzielten Ergebnisse der mittels Screening-PCR „BAC-Screen“ nachgewiesenen spezifischen bakteriellen DNA wurden anhand des kommerziellen Bac-IDent Kit der Firma HAIN Lifescience (Abschnitt 3.6) nachuntersucht. Hierzu wurden die „BAC-Screen“-DNA-Amplifikate der DNA-STRIP-Technologie des GenoType Bac-IDent-Kit zugeführt. Über eine Hybridisierung und alkalische Phosphatase-Reaktion zeigen sich die spezifisch gebundenen Amplifikate auf einem Membranstreifen. Durch Anlage einer Schablone an die Membranstreifen kann das Testergebnis ausgewertet und der jeweils detektierten Bakterienspezies zugeordnet werden. Abbildung 18 zeigt, dass das zuvor erzielte Ergebnis eines positiven bakteriellen DNA-Nachweises der Proben DSM30501 (Staphylococcus aureus), DSM11866 (Streptococcus pneumoniae) und der Synoviaprobe F6 bestätigt werden konnte.

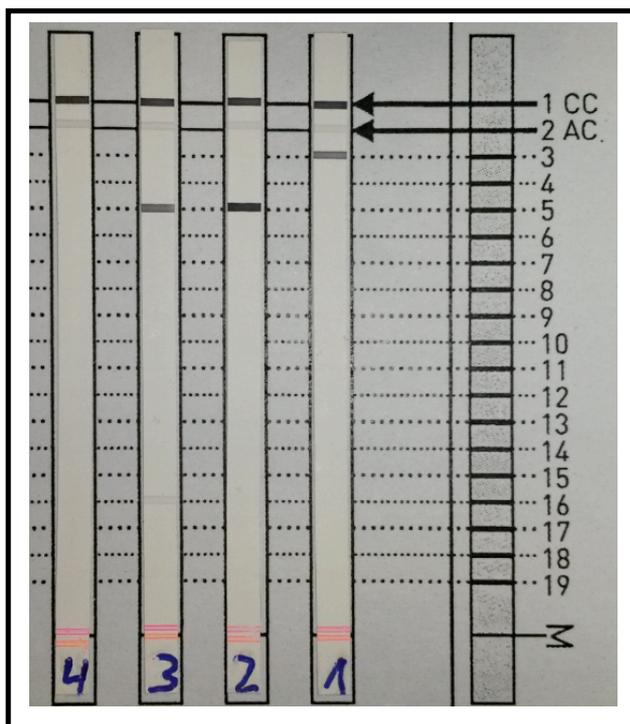


Abb. 18: Nachuntersuchung der per Screening-PCR hergestellten Amplifikate der Proben DSM30501 (auf Streifen 1), DSM11866 (auf Streifen 2), Synovia-F6 (auf Streifen 3) sowie einer Negativkontrolle (auf Streifen 4) mittels DNA-STRIP-Technologie des GenoType Bac-IDent Kit. Auf den Membranstreifen 1 wurde die definierte Bakterien-DNA von Staphylococcus aureus (DSM30501) aufgetragen. Die spezifisch gebundenen Amplifikate dieser Probe werden auf dem Membranstreifen in Form einer Bande mit der Nummer 3 sichtbar. Die Zuordnung der Bandennummern zu den jeweiligen Bakterienspezies erfolgt durch Anlage einer dem Bac-IDent-Kit beiliegenden Auswertungsschablone, wie sie in Abb. 4 gezeigt ist. Für die Bande Nummer 3 auf dem ersten Membranstreifen ergibt sich damit der Nachweis von Staphylococcus

aureus. Membranstreifen 2 zeigt das Vorhandensein der definierten Bakterien-DNA von *Streptococcus pneumoniae* (DSM11866) durch die Signalanhebung der Bande Nummer 5. Membranstreifen 3 zeigt die per Bac-IDent aus der Synovia-Probe F6 detektierten Bakterien-DNA der Spezies *Enterobacter cloacae* (Bande Nummer 16) und *Streptococcus pneumoniae* (Bande Nummer 5). Die aus destilliertem Wasser bestehende Negativkontrolle erzeugt keine Bande.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich mittels der für diese Studie entwickelten Screening-PCR „BAC-Screen“ häufig auftretende Bakterienstämme effizient in humanen Proben nachweisen lassen.

5.1 Probenauswahl

Ein Schwerpunkt bei der Auswahl der humanen Proben war deren klinische Relevanz. Im Rahmen von entzündlichen Arthropathien ist eine Gelenkpunktion wichtiger Bestandteil des diagnostischen Vorgehens. Die Untersuchung der dabei gewonnenen Synovialflüssigkeit auf bakterielle Keime dient dem Behandelnden als wichtiges Kriterium zur Einleitung spezifischer Therapien. Gelenkflüssigkeitsproben erwiesen sich im Rahmen dieses Forschungsprojekts als gut verwendbares humanes Probenmaterial. In allen Proben, wo eine Infektion bekannt war, konnte dies mithilfe der Methode bestätigt werden.

Bei Folgestudien wäre darüber hinaus die Verwendung von Blut oder Geweben, wie beispielsweise Muskulatur, als humane Proben denkbar.

5.2 Extraktionsverfahren

Grundsätzlich ist für die vorgestellte Nachweismethode die Extraktion bakterieller DNA anhand verschiedener Verfahren möglich. Beim Vergleich der beiden manuellen Extraktionsmethoden Spin Swab (Stratec) und BacExtract (HAIN Lifescience) konnte mittels der Agarosegelelektrophorese bei erstgenannter Methode eine bessere Ausbeute der DNA und damit zufriedenstellendes Extraktionsresultat erzielt werden. Zudem erwies sich das Spin Swab Kit auch unter Berücksichtigung der wirtschaftlichen und finanziellen Aspekte als das für diese Arbeit Überlegene der beiden manuellen Extraktionsverfahren. Ausschlaggebend hierfür ist eine Zeitersparnis bei der Durchführung und damit einhergehende Kostenreduktion, da die Extraktion mittels Spin Swab Kit durch eine einmalige nächtliche Inkubation einen am Folgetag rascheren weiteren Arbeitsablauf ermöglicht. Die Extraktion per BacExtract Kit bedeutete hingegen einen weniger stringenten Arbeitsablauf durch eine Gliederung in deutlich mehr einzelne Arbeits- und Inkubationsschritte. Zudem erforderte sie die Überwachung der einzelnen Prozesse durch den Mitarbeiter während des gesamten Prozedere.

Das halbautomatische Extraktionsverfahren (King Fisher Flex; Thermo Scientific) war bei vergleichbarem Extraktionsresultat das Zeit- und Kostensparenste. Die halbautomatische Extraktionsmethode führt dabei den Waschvorgang selbständig durch. Neben diesem geringeren Zeitaufwand bietet das halbautomatische Verfahren zudem finanzielle Einsparungen beim Verbrauch von Filtereinsätzen und Reaktionsgefäßen, da diese mehrfach für den Reinigungsschritt eingesetzt werden können.

In der gesamtheitlichen Betrachtung fiel die Wahl der DNA-Extraktionsmethode für diese Arbeit daher auf das halbautomatische Verfahren mit dem King Fisher Flex der Firma Thermo Scientific.

5.3 Validierung der Screening-PCR

Zur Validierung der Screening-PCR wurden definierte Bakterienstämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) untersucht. Alle vier Stämme (DSM30501: *Staphylococcus aureus*, DSM11866: *Streptococcus pneumoniae*, DSM20477: *Enterococcus faecium* und DSM50071: *Pseudomonas aeruginosa*) wurden durch die Screening-PCR korrekt detektiert.

Nach der Etablierung erfolgten Tests an humanen Speichel- und Gelenkflüssigkeitsproben. Eine exemplarische Sequenzierung dreier positiv auf Bakterien getesteter Proben identifizierte in der Analyse mit dem BLAST Algorithmus jeweils die Sequenz des mittels Screening-PCR „BAC-Screen“ festgestellten Bakteriums.

Die kapillarelektrophoretische Untersuchung auf dem Genetic Analyzer ABI Prism 3130 war ebenso möglich. Die spezifischen Produkte der Bakterien konnten bei einem Einsatz von 5ng DNA beziehungsweise einer Verdünnung der Stammlösung von 1:100 erfolgreich dargestellt werden.

Eine Nachuntersuchung von Proben mit dem kommerziellen BacIdent Kit der Firma HAIN Lifescience bestätigte darüber hinaus das zuvor erzielte Ergebnis (positiver Nachweis bakterieller DNA bzw. kein Nachweis möglich).

5.4 Einsatz der Singleplex-PCR „BAC-Screen“ als Screeningmethode in der Laborroutine

Die vorgestellte Nachweismethode erwies sich als einfach in die Laborroutine zu integrierendes Verfahren. Sie dauert inklusive PCR lediglich circa 6 Stunden. Die Anschaffung spezieller laboratorischer Hilfsmittel oder Geräte ist dabei nicht notwendig. Damit wird eine schnelle und kostengünstige Screening-Methode zum Nachweis von vier gängigen und medizinisch bedeutsamen Bakterienstämmen (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* und *Pseudomonadaceae*) bereitgestellt. Die Amplifikate des Screeningansatzes lassen sich für die genaue Identifizierung der Bakterien sequenzieren. Eine weitere Reduzierung der Kosten und eine vom Genetic Analyzer abhängige weitere Zeitersparnis kann erzielt werden, wenn auf die beschriebene Kapillarelektrophorese verzichtet und lediglich ein Agarosegelnachweis durchgeführt wird.

5.5 Gegenüberstellung des molekulargenetischen Testsystems und des kulturellen Erregernachweises

Der Nachweis und die Identifikation von bakteriellen Erregern haben im medizinischen und wissenschaftlichen Kontext einen hohen Stellenwert. Hierzu werden Bakterien im Labor künstlich vermehrt. Diese als Bakterienkultur bezeichnete Nachweismethode stellt den Goldstandard der bakteriologischen Diagnostik dar. Erst der kulturelle Nachweis des Erregers gilt als endgültiger Beweis der Erkrankungsursache (Hof & Dörries, 2009). Dennoch erscheint das in dieser Forschungsarbeit entwickelte molekulargenetische Testsystem als prinzipiell wirksames Nachweisverfahren eine zukunftssträchtige Ergänzung darzustellen. Insbesondere die rasche und unkomplizierte Durchführbarkeit sind als Stärke hervorzuheben, was gerade für den klinischen Alltag ein gewichtiges Kriterium ist. Die kulturelle Anzucht von Bakterien kann einen längeren Zeitraum in Anspruch nehmen und insbesondere dann erschwert sein, wenn eine geringe Keimzahl vorliegt. Für die molekulargenetische Untersuchung von Virulenzfaktoren, wie beispielsweise der bakteriellen Expression von Endo- und Exotoxinen, wären hingegen noch weitere Untersuchungen durchzuführen, etwa die Analyse von Virulenzfaktorgenen. Die Verwendung der molekulargenetischen Analysemethode ist jedoch beispielsweise als schnelle und kostengünstige Screening-Methode zum Nachweis häufig auftretender Bakterienstämme denkbar. Darüber hinaus lässt sich das molekulargenetische

Verfahren einfach in eine bereits vorhandene Laborroutine aufnehmen. Dies betrifft neben zu verwendenden Materialien und Gerätschaften auch die Durchführbarkeit durch das vorhandene Personal.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Nachweis von Bakterien ist sowohl von klinischer als auch forensischer Relevanz. Neben der klassischen Kulturanzüchtung mit anschließender Differenzierung gibt es die Möglichkeit diese mit kommerziellen, in der Regel teuren und zeitaufwändigen Nachweiskits zu bestimmen. Die Identifikation einer Bakterienspezies ist zudem durch Sequenzierung spezifischer bakterieller DNA-Fragmente möglich. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer rasch durchführbaren, unkomplizierten und kostengünstigen molekulargenetischen Screening-Analyse zum Nachweis häufig auftretender Bakterienstämme wie *Staphylococcus spec.*, *Streptococcus spec.*, *Enterococcus spec.* und *Pseudomonas*.

Als humanes Probenmaterial wurde Speichel und Gelenkflüssigkeit verwendet. Die Extraktion der darin enthaltenen bakteriellen DNA erfolgte mittels der halbautomatischen Methode auf dem King Fisher Flex-Gerät der Firma Thermo Scientific. Es stellte sich als das effektivste und kostengünstigste Extraktionsverfahren heraus. Die Identifizierung der ausgewählten Bakterienspezies erfolgte anhand der Amplifizierung speziesübergreifender bakterieller Genomabschnitte mittels einer PCR. Dafür wurde ein Primerpaar in Anlehnung an die Literatur (Sauer et al., 2005) entwickelt, das für die Bakterienarten *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* spezifisch ist. Aus der Polymerasekettenreaktion resultierten spezifische Fragmente der Länge zwischen 270 und 405 Basenpaaren. Eine kapillarelektrophoretische Analyse mit 6-FAM markierten Primern ermöglichte die Darstellung der spezifischen Amplifikate ihrer Länge und relativen Menge nach. Dabei ergaben sich für *Staphylococcus species* spezifische Fragmente mit 272-274 Basenpaaren, für *Streptococcus species* Amplifikate mit 274-276 Basenpaaren, für *Pseudomonas species* Fragmente mit 292-294 Basenpaaren und für *Enterobacter cloacae* Fragmente mit 294-296 Basenpaaren. Die Validierung dieser Screening-PCR konnte erfolgreich über definierte Bakterienstämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen durchgeführt werden.

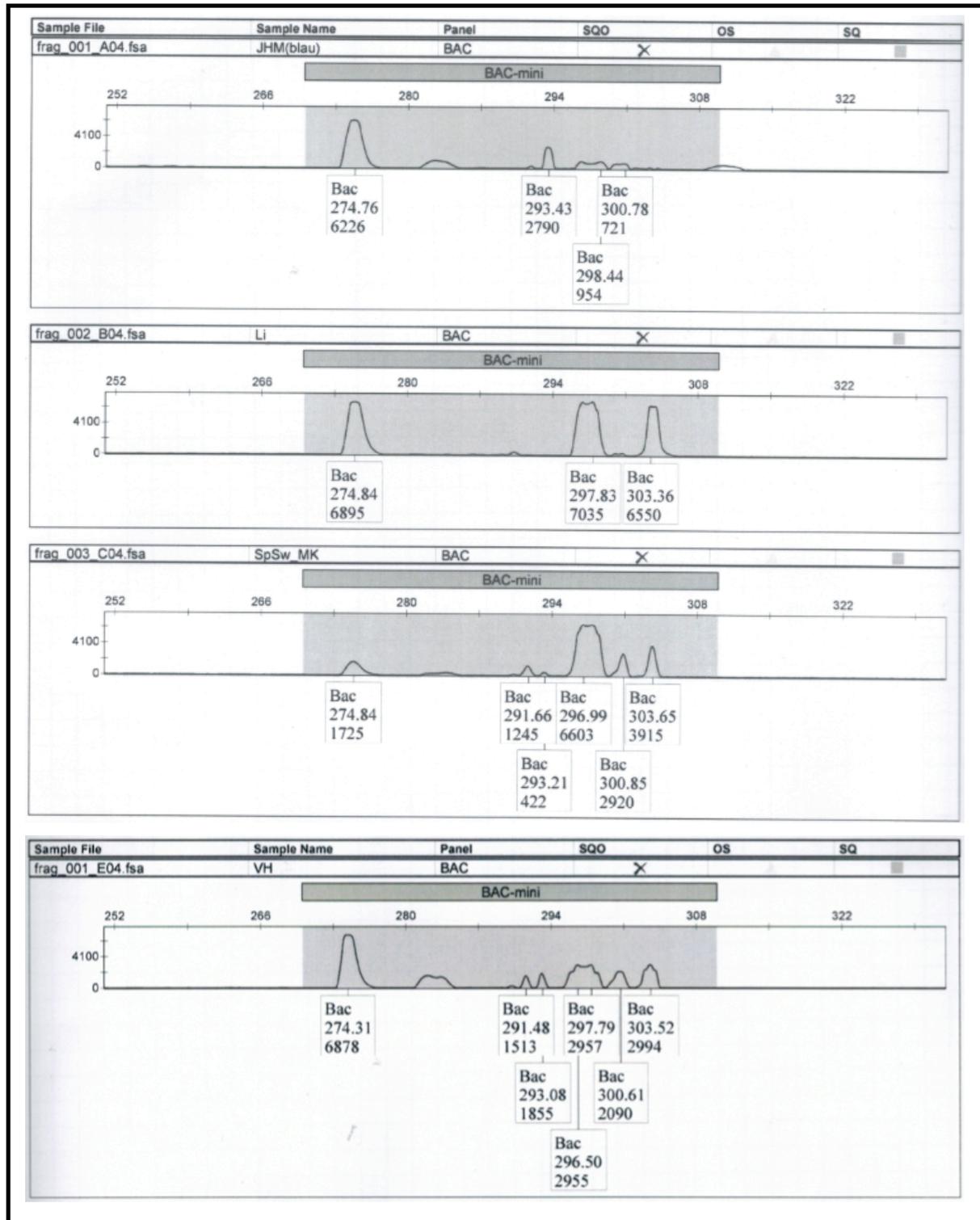
Die Untersuchung von 48 Gelenkflüssigkeitsproben mit der entwickelten Screening-PCR ergab einen positiven Bakteriennachweis bei 3 Proben, die übrigen 45 Proben wiesen keine Bakterien auf. Mittels einer exemplarischen Sequenzierung der Peaks einer Synoviaprobe konnte durch die Analyse mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) die Sequenz

des per Screening-PCR amplifizierten Fragments bestimmt und das Bakterium identifiziert werden. Eine Nachuntersuchung mit dem kommerziellen Nachweiskit GenoType Bac-Ident, das ein DNA-Hybridierungsverfahren zur Bakterienidentifizierung verwendet, bestätigte das Ergebnis.

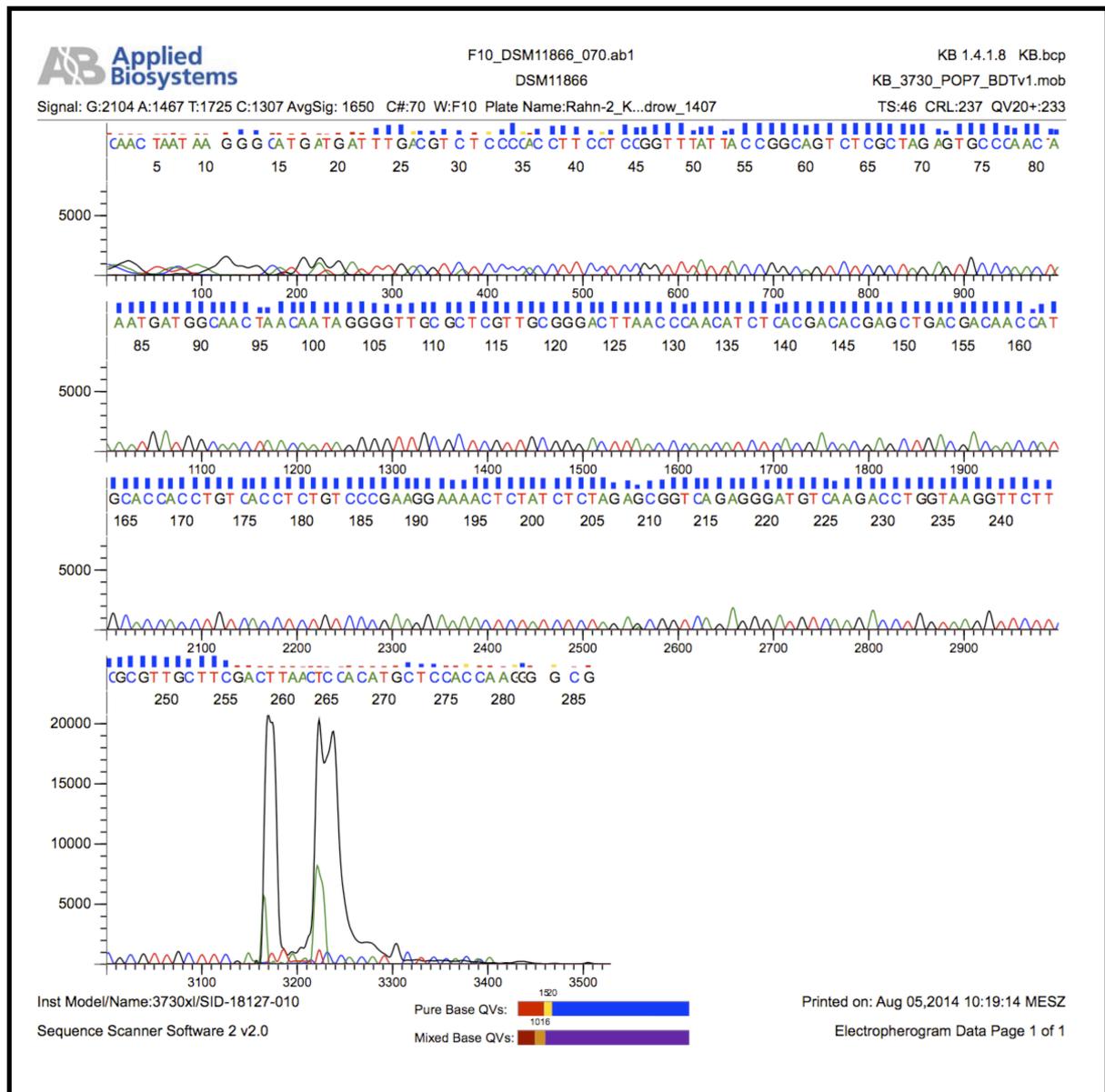
Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, in humanem Probenmaterial mit einer Screening-PCR Bakterien bei klinischem Verdacht zu identifizieren. Die vorgestellte Nachweismethode ist einfach in die Laborroutine zu implementieren und nimmt inklusive PCR lediglich 6 Stunden in Anspruch. Damit steht eine schnelle und kostengünstige Screening-Methode zum Nachweis der häufigen und medizinisch relevanten Bakterienstämme Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus und Pseudomonaceae zur Verfügung.

7. ANHANG

Elektropherogramme der Mitarbeiterspeichelproben (Abschnitt 4.2.2):



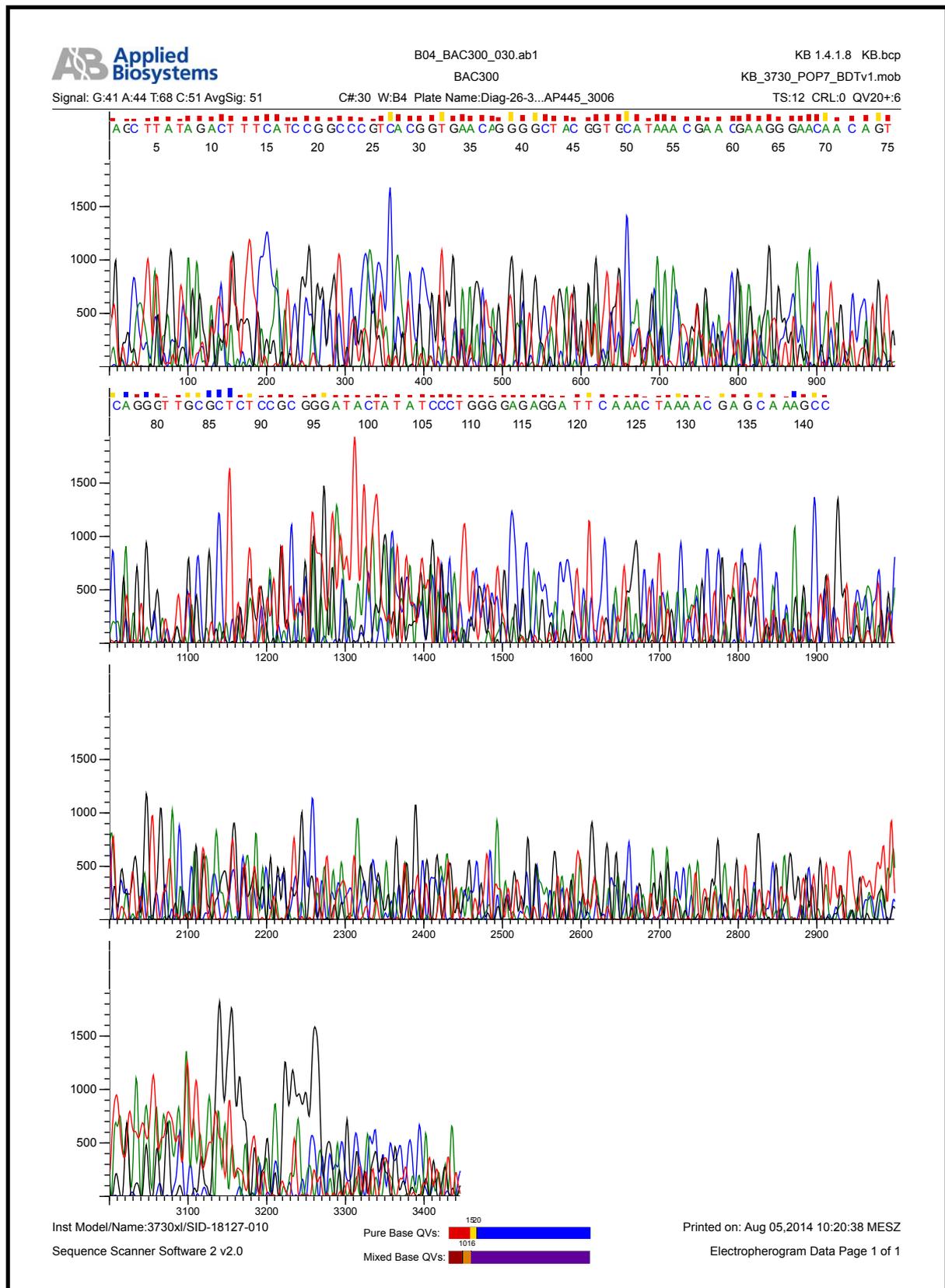
Sequenzierungsergebnis der gekauften DSM11866-Probe Streptococcus pneumoniae (Abschnitt 4.3):



Sequenzdatenanalyse der gekauften DSM11866-Probe Streptococcus pneumoniae (Abschnitt 4.3):

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
455 bits(246)	1e-124()	251/253(99%)	2/253(0%)	Plus/Minus	
Features:					
Query	7	ATAA-GGGCATGATGATTTGACGTC-TCCCCACCTTCCTCCGGTTTATTACCGGCAGTCT			64
Sbjct	1160	ATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATTACCGGCAGTCT			1101
Query	65	CGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC			124
Sbjct	1100	CGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC			1041
Query	125	TTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTCTGTC			184
Sbjct	1040	TTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTCTGTC			981
Query	185	CCGAAGGAAAACCTATCTCTAGAGCGGTCAGAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTT			244
Sbjct	980	CCGAAGGAAAACCTATCTCTAGAGCGGTCAGAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTT			921
Query	245	CGCGTTGCTTCGA	257		
Sbjct	920	CGCGTTGCTTCGA	908		

Sequenzierungsergebnis von Fragment 1 der Synoviaprobe F6 (Abschnitt 4.3):



Sequenzdatenanalyse von Fragment 1 der Synoviaprobe F6 (Abschnitt 4.3):

Klebsiella pneumoniae JM45, complete genome					
Sequence ID: ref NC_022082.1 Length: 5273813 Number of Matches: 1					
Range 1: 1826203 to 1826229					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
35.6 bits(38)	7.0()	24/27(89%)	0/27(0%)	Plus/Plus	
Features:					
glycosyl transferase group 1 family protein					
Query	12	CAGTCAGGGTTGCGCTCTCCGCGGGAT	38		
Sbjct	1826203	CAGTCAGGGTTGCGCCCGCCGGGGAT	1826229		

8. LITERATURVERZEICHNIS

Metcalf, J. L., Xu, Z. Z., Weiss, S., Lax, S., Van Treuren, W., Hyde, E. R., Song, S. J., Amir, A., Larsen, P., Sangwan, N., Haarmann, D., Humphrey, G. C., Ackermann, G., Thompson, L. R., Lauber, C., Bibat, A., Nicholas, C., Gebert, M. J., Petrosino, J. F., Reed, S. C., Gilbert, J. A., Lynne, A. M., Bucheli, S. R., Carter, D. O., Knight, R. (2016): *Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition*. Science (New York, N.Y.), 351, 158-162.

Sauer, P., Gallo, J., Kesselova, M., Kolar, M., Koukalova, D. (2005): *Universal primers for detection of common bacterial pathogens causing prosthetic joint infection*. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia, 149, 285-288.

Bücher:

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2011): *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Auflage, Wiley-Blackwell, Weinheim.

Applied Biosystems. (2010): *User Bulletin Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers Using Data Collection Software 3.0*. Applied Biosystems, Foster City.

Bast, E. (2014): *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. 3. Auflage, Springer Spektrum, Heidelberg.

Berens von Rautenfeld, D., Christ, B., Dermietzel, R., Drenckhahn, D., Düllmann, J., Duncker, H.-R., Fahimi, H. D., Fleischhauer, L., Forssmann, W.-G., Kugler, P., Pabst, R., Putz, R., Rahn, B. A., Schmidt, H.-M., Schnittler, H.-J., Staubesand, J., Wulfhekel, U. (1994): *Benninghoff - Anatomie: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. 15. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München.

Bommas-Ebert, U., Teubner, P., Voß, R. (2006): *Anatomie und Embryologie*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Brandis, H., Eggers, H. J., Köhler, W., Pulverer, G. (1994): *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wassermann, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B. (2009): *Biologie*. 8. Auflage, Pearson Education, Inc., München.

Emminger, H. (2005): *Physikum Exakt*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F., Suerbaum, S. (2009): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg.

HAIN Lifescience. (2012): *BacExtract Arbeitsanleitung*. 1. Auflage, Hain Lifescience GmbH, Nehren.

HAIN Lifescience. (2012): *GenoType Bac-IDent Arbeitsanleitung*. 1. Auflage, Hain Lifescience GmbH, Nehren.

Hirsch-Kauffmann, M., Schweiger, M. (2004): *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Hof, H., Dörries, R. (2009): *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.

Kalden, J. R., Baenkler, H. W., Botzenhardt, U., Brackertz, U., Brune, K., Burmester, G. R., Herzer, P., Lemmel, E.-M., Manger, B., Mohr, W., Sailer, D., Weseloh, G. (1988): *Klinische Rheumatologie*. Springer-Verlag, Heidelberg.

Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994): *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M. (1998): *Medizinische Mikrobiologie: verstehen, lernen, nachschlagen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kayser, F. H., Böttger, E. C., Zinkernagel, R. M. (2010): *Medizinische Mikrobiologie*. 12. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Lippert, H. (2006): *Lehrbuch Anatomie*. Elsevier - Urban & Fischer Verlag, München.

Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C. (2007): *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg.

Löffler, G. (2003): *Basiswissen Biochemie*. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin.

Manger, B., Häfner, R., Hellmich, B., Schulze-Koops, H., Tillmann, K., Truckenbrodt, H. (2005): *Checkliste XXL - Rheumatologie*. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Moll, K. J., Moll, M. (1997): *Anatomie*. 15. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Mülhardt, C. (2009): *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Newton, C. R., Graham, A. (1997): *PCR*. 2. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg, Oxford.

Rohen, J. W., Lütjen-Drecoll, E. (2006): *Funktionelle Anatomie des Menschen: Lehrbuch der makroskopischen Anatomie nach funktionellen Gesichtspunkten*. 11. Auflage, Schattauer GmbH, Stuttgart.

Schrimpf, G. (2002): *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Stratec. (2013): *Invisorb Spin Swab Kit User Manual*. STRATEC Molecular GmbH, Berlin.

Thermo Scientific. (2010): *KingFisher Flex User Manual*. Thermo Scientific, Vantaa (Finland).

Watson, J. D., Crick, F. H. (1953): *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 171, 737-738.

Zeidler, H., Zacher, J., Hiepe, F. (2008): *Interdisziplinäre klinische Rheumatologie*. 2. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Diplomarbeiten:

Modrow, J.-H. (2011): *Expression von HSP70 und Alterationen der mitochondrialen DNA im menschlichen Gehirn als Biomarker in der forensischen Diagnostik*. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

Dissertationen:

Modrow, J.-H. (2014): *Entwicklung molekularbiologischer Methoden und Aufbau einer Datenbank zur Identitäts-, Mischlings- und Abstammungsanalyse ausgewählter Tierarten*. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

Internetseiten:

Biomedical-Research-Core-Facilities (2018). *Interpretation of Sequencing Chromatograms*. <https://seqcore.brcf.med.umich.edu/sites/default/files/html/interpret.html>.

Hagemann, O. (2004). *Laborlexikon*. <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/a/Arthritis-Bakteriologie.htm>.