

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K. Pfeffer

Evaluation einer molekulargenetischen Methode
zum Nachweis bakterieller Erreger aus primär
sterilen Patientenmaterialien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Luisa Steindor
2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöckner

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

*Gewidmet meinen Eltern,
Locke
und Omi*

Zusammenfassung

Bakterielle Infektionen in primär sterilen Kompartimenten des Körpers sind eine häufig auftretende Problematik im klinischen Alltag. Viele daraus resultierende Krankheitsbilder dieser Gruppe weisen hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten auf. Entscheidend für das *outcome* der Patienten ist dabei die korrekte und zeitnahe Identifikation des ursächlichen Pathogens, die die Voraussetzung für die schnellstmögliche Einleitung einer gezielten antibiotischen Therapie schafft. Das kulturelle Anzichten von Bakterienspezies stellt immer noch den Goldstandard unter den mikrobiologischen Nachweismethoden dar. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob das GenoType-Verfahren der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) zum Nachweis von Erregern aus primär sterilen Patientenproben geeignet ist. Ursprünglich wurde das GenoType-Verfahren für den Nachweis von Erregern aus Blutkulturen konzipiert und ist in diesem Bereich bereits in die Routine von mikrobiologischen Laboratorien integriert. Bei dem GenoType-Verfahren handelt sich um ein *multiplex* PCR-Verfahren mit anschließender Speziesidentifikation mittels reverser Hybridisierung und *line-blotting*. Zum Vergleich wurde eine 16S *broad-range* PCR mit darauffolgender Sequenzierung nach Sanger herangezogen. Als Referenzmethode diente die Kultur. Der GenoType wies in der vorliegenden Studie eine Sensitivität von 67,2 % und eine Spezifität von 80,4 % auf. Damit war er der studieninternen 16S *broad-range* PCR in der Sensitivität deutlich überlegen (GT: 67,2 % vs. 16S: 32,8 %), zeigte aber eine geringere Spezifität (GT: 80,4 % vs. 16S: 92,8 %). Ein Grund für die niedrige Sensitivität und Spezifität könnte vor allem die hohe Kontaminationsanfälligkeit sein. Auch bei der Praktikabilität weist das GenoType-Verfahren vor allem in den Arbeitsschritten der DNA-Aufreinigung und der Speziesidentifikation Defizite auf. Für die Integration in die Routine von mikrobiologischen Laboratorien für andere Materialien als positive Blutkulturen (für die es zuverlässige Ergebnisse liefert) scheint das GenoType-Verfahren anhand unserer Studienergebnisse nicht geeignet. Dennoch muss eine höhere Sensitivität von PCR-basierten Verfahren bei bestimmten Bakterienspezies diskutiert werden. Zur abschließenden Beurteilung der vielen positiven Ergebnisse bedürfte es allerdings anderer Studiendesigns, die sowohl die mikrobiologischen Ergebnisse als auch die klinischen und laborchemischen Parameter der Patienten interdisziplinär zusammenführen.

Abstract

Bacterial infections in primarily sterile sites are a frequently encountered clinical condition often causing severe bacterial infections, which significantly contribute to morbidity and mortality worldwide. Rapid and accurate detection of pathogens allows early targeted therapy and improves patient outcome. Cultivation of bacterial species remains the gold standard for microbiological diagnosis of infection. This study investigates the usefulness of the GenoType method from Hain Lifescience (Nehren, Germany), which is primarily aimed at identifying the organism in positive blood culture bottles, in detecting the causative organism in primary specimens obtained from anatomically sterile sites. This is a multiplex PCR method with a subsequent line-blot identification step. The reference method was routine culture and, in addition, an in-house 16S broad range PCR was used as a comparison method.

The GenoType investigated in this study demonstrated a sensitivity of 67.2 % and specificity of 80.4 % and in comparison, the 16S broad range PCR had a sensitivity and specificity of 32.8 % and 92.8 % respectively. A possible explanation for the low sensitivity and specificity could be the high contamination rate whereby the DNA extraction and species identification (hybridization) steps were prone to contamination errors. Overall it appears that the method is not suitable for use in the routine diagnostic of specimens from sterile site other than blood cultures, for which it has a proven value. Nevertheless, a generally higher sensitivity and specificity for PCR-based methods requires further evaluation and discussion. A comprehensive evaluation of the results would require a more extensive study design including clinical and other laboratory parameters.

Abkürzungsverzeichnis

AC	Amplifikationskontrolle
<i>aqua dest.</i>	<i>aqua destillatum</i>
BMFZ	Biologisch-medizinisches Forschungszentrum
CC	Konjugatkontrolle
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GT	GenoType
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBP	Penicillin-bindendes Protein
rRNA	ribosomale <i>ribonucleic acid</i>
spp.	Spezies
UV	Ultraviolett
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
vs.	versus

Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cm ²	Quadratzentimeter
g	Erdbeschleunigung
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ng	Nanogramm
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
S	Svedberg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Bakterielle Infektionen in primär sterilen Kompartimenten des Körpers</i>	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Aktuelle Bedeutung	1
1.1.3	Klinische Relevanz und bakterielle Erregerspektren ausgewählter Erkrankungen	1
1.2	<i>Nachweismethoden in der klinischen Routine</i>	5
1.2.1	Grenzen konventioneller Nachweismethoden	6
1.2.2	Neuere molekulargenetische Nachweismethoden: PCR-Verfahren	7
1.2.3	Nachteile der PCR-Verfahren	9
1.2.4	Vorteile der PCR-Verfahren	11
1.2.5	Antibiotikaresistenzen	11
1.3	<i>Ziele der Arbeit</i>	13
2	Material und Methoden	14
2.1	<i>Proben</i>	14
2.1.1	Ethische Prüfung	15
2.2	<i>Materialien</i>	15
2.2.1	GenoType	15
2.2.2	16S/18S <i>broad-range</i> PCR	17
2.3	<i>Methoden</i>	19
2.3.1	GenoType	19
2.3.2	16S/18S <i>broad-range</i> PCR	25
3	Ergebnisse	29
3.1	<i>Ergebnisse GenoType Bac-IDent</i>	29
3.2	<i>Vergleich GenoType Bac-IDent zu Kultur</i>	30
3.2.1	Sensitivität und Spezifität des GenoType	32
3.2.2	Diskrepante Ergebnisse GenoType/Kultur	32
3.3	<i>Vergleich broad-range PCR zu Kultur</i>	37
3.3.1	Sensitivität und Spezifität der <i>broad-range</i> PCR	38
4	Diskussion	39
4.1	<i>Diskrepante Ergebnisse</i>	39
4.2	<i>Interpretation positiver Ergebnisse</i>	41
4.3	<i>Sensitivität und Spezifität des GenoType</i>	42
4.4	<i>Kultur – guter Goldstandard?</i>	43
4.5	<i>Resistenzbestimmung</i>	44
4.6	<i>Erregerspektrum</i>	44
4.7	<i>Kontaminationsanfälligkeit</i>	45
4.8	<i>Praktikabilität</i>	46
4.9	<i>Zeitaufwand</i>	46
4.10	<i>Schlussfolgerungen</i>	47
5	Literaturverzeichnis	49

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Infektionen in primär sterilen Kompartimenten des Körpers

1.1.1 Definition

Zu den als primär steril bezeichneten Kompartimenten des Körpers gehören Blut, Liquor, pleurale, peritoneale, perikardiale und synoviale Flüssigkeiten, Knochen sowie andere innenliegende Gewebe wie Lymphknoten, Gehirn, Herz, Leber, Milz, Niere, Pankreas, Ovar und Gefäße. Bakterielle Infektionen dieser Kompartimente entstehen durch invasive Erkrankungen, chirurgische oder interventionelle Eingriffe bzw. Manipulationen an lokalen Infektionen, spontan durch Bakteriämie, aber auch durch unklare Ursachen, wie z.B. gelegentlich bei septischen Arthritiden oder Osteitiden.

1.1.2 Aktuelle Bedeutung

Infektiöse Krankheiten gehören nach wie vor zu den Hauptursachen von Morbidität und Mortalität weltweit [1]. Im klinischen Alltag stellen bakterielle Infektionen in primär sterilen Kompartimenten des Körpers eine häufig auftretende Problematik dar. Dazu gehören die bakterielle Meningitis, Pleuritis, Peri- und Endokarditis, Peritonitis, septische Arthritis und andere. Die schnelle Einleitung einer geeigneten antimikrobiellen Therapie ist dabei entscheidend für das *outcome* der Patienten [2].

1.1.3 Klinische Relevanz und bakterielle Erregerspektren ausgewählter Erkrankungen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Proben aus ausgewählten primär sterilen Kompartimenten des Körpers eingeschlossen. Es handelte sich vornehmlich um Proben, die der mikrobiologischen Diagnostik unten aufgeführter häufiger und schwerwiegender Verdachtsdiagnosen dienen. Bisher ist das GenoType-Verfahren nur für den Bakteriennachweis aus Blutkulturen zugelassen, es eignet sich aber

grundsätzlich für alle Materialien, die keine Bakterien der physiologischen Flora des menschlichen Körpers beinhalten.

1.1.3.1 Bakterielle Meningitis

Die bakterielle Meningitis ist eine schwerwiegende Erkrankung des zentralen Nervensystems, die durch direkt schädigende Einflüsse der Infektion, aber auch die begleitende lokale und systemische Inflammationsreaktion zu mitunter erheblichen neurologischen Schäden bis hin zum Tod führen kann [3]. Die Inzidenz variiert weltweit stark mit Zahlen von ein bis zwei auf 100.000 Menschen pro Jahr in Großbritannien und Westeuropa [4] und bis zu 1000 auf 100.000 Menschen pro Jahr in der Sahelzone Afrikas [5]. Die Anzahl an Todesfällen verursacht durch bakterielle Meningitis wird jährlich auf über 275.000 weltweit geschätzt [6]. Bleibende neurologische Schäden treten bei ca. 25 bis 50 % der Überlebenden auf [7]. Die häufigsten Erreger der bakteriellen Meningitis in den USA und Europa sind *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* Typ b, *Neisseria meningitidis*, Streptokokken der Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*) und *Listeria monocytogenes* [8, 9]. Seit Einführung der Impfungen gegen *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* Typ b und *Neisseria meningitidis* sind die Inzidenzraten von Infektionen durch diese Erreger in den Industrieländern rückläufig, die bakterielle Meningitis bleibt aber eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität weltweit. Dies liegt zum einen an mangelhaften globalen Impfquoten und zum anderen an nicht von den Impfungen erfassten Serotypen der bakteriellen Meningitiserreger, wie z.B. einigen Pneumokokken-, *Haemophilus influenzae*- und Meningokokken-Serotypen [10].

1.1.3.2 Bakterielle Pleuritis

Bakterielle Pleuritiden stellen die Medizin schon seit Jahrhunderten vor Probleme [11]. Sie entstehen vor allem post-traumatisch, post-operativ oder durch Pneumonie [12]. Derzeit liegt die Inzidenz bei etwa 80.000 pro Jahr in den USA und Großbritannien [13]. Betroffen sind vor allem pädiatrische und ältere Patienten [13]. In einer 2006 publizierten Studie von Maskell et al. wurden die Mortalitätsraten auf 47 % für die nosokomial erworbene Pleuritis sowie auf 17 % für die ambulant erworbene Pleuritis beziffert [11]. Auch das Erregerspektrum variiert laut dieser Studie aus dem

Vereinigten Königreich Großbritannien zwischen ambulant und nosokomial erworbener Pleuritis: Mit etwa 50 % sind Streptokokken (v.a. *Streptococcus intermedius-anginosus-constellatus*-Gruppe und *Streptococcus pneumoniae*) die häufigsten Erreger der ambulant erworbenen Pleuritis, 20 % fallen auf Anaerobier (v.a. *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp. und *Prevotella* spp.) und 10 % auf Staphylokokken (v.a. *Staphylococcus aureus*). Bei der nosokomial erworbenen Pleuritis überwiegen mit 60 % multi-resistente Bakterien: MRSA (25 %), Enterobacteriaceae (18 %), Enterokokken (12 %) und *Pseudomonas* spp. (5 %) [11].

1.1.3.3 Infektiöse Endokarditis

Der Begriff der infektiösen Endokarditis umfasst sowohl die Infektion von Herzklappen oder anderen endokardialen Strukturen als auch die Infektion von kardialen implantierten elektronischen Geräten [14]. Mit einer Inzidenz von drei bis neun auf 100.000 Menschen in Industrieländern [15] und Mortalitätsraten von 15 bis 20 % (während des stationären Aufenthaltes) sowie bis zu 40 % (innerhalb eines Jahres) [16] ist die infektiöse Endokarditis eine häufig auftretende und schwerwiegende Erkrankung. Auch die Komplikationsrate ist hoch: die Zahlen liegen bei 48,2 % für die Notwendigkeit einer chirurgischen Therapie, bei 32,3 % für Herzinsuffizienz, bei 16,9 % für Schlaganfälle, bei 22,6 % für andere embolische Ereignisse und bei 14,4 % für intrakardiale Abszesse [17]. Zu den häufigsten Erregern zählen *Staphylococcus aureus* (54,3 %), *Streptococcus viridans*, Koagulase-negative Staphylokokken, *Enterococcus* spp. und *Streptococcus bovis* [18].

1.1.3.4 Akute Mediastinitis

Die akute Mediastinitis ist die thorakale Infektion mit der höchsten Mortalität [19]. Hauptursachen sind die iatrogene Einschleppung von Infektionen bei chirurgischen Eingriffen, Intubation oder Endoskopie [20, 21], gefolgt von direkter oder hämatogener Streuung anderer Foci und traumatischen Ursachen [22]. Die schwersten Komplikationen sind der septische Schock, Multiorganversagen sowie der Tod [23] mit einer Mortalitätsrate von bis zu 40 % [24]. Abhängig von der Ursache findet man als Erreger der akuten Mediastinitis vor allem Staphylokokken (nach kardiochirurgischen Eingriffen, siehe weiter unten), Bakterien der oropharyngealen Flora (bei direkter Streuung oder Ösophagusperforation) und multi-resistente Bakterien (z.B. bei

immunsupprimierten Patienten oder Patienten mit konsumierender Erkrankung) [25]. In einer großen retrospektiven Studie über die akute postoperative Mediastinitis in Frankreich konnten folgende Erreger als Hauptursache identifiziert werden: *Staphylococcus aureus* in 31,9 % der Fälle, Gram-negative Bakterien in 28,3 % (davon *Escherichia coli* 22,3 %, *Klebsiella pneumoniae* 18,5 %, *Enterobacter cloacae* 18,5 %, *Proteus mirabilis* 7,8 %, *Serratia marcescens* 8 %, *Citrobacter koseri* 5,8 %, *Enterobacter aerogenes* 4,8 % u.a.), *Pseudomonas aeruginosa* in 5,8 %, *Haemophilus influenzae* in 2,9 %, *Bacteroides fragilis* in 1,9 % und *Stenotrophomonas maltophilia* in 1 % der Fälle [26].

1.1.3.5 Spontane bakterielle Peritonitis

Die spontane bakterielle Peritonitis entsteht durch transmurale, lymphogene oder seltener hämatogene Streuung einer Infektion in den Peritonealraum in Abwesenheit einer viszeralen Perforation, einer intraabdominellen Entzündung oder eines intraabdominellen malignen Prozesses [27, 28]. Die Inzidenz der spontan bakteriellen Peritonitis bei Patienten mit Aszites liegt zwischen sieben und 30 % [29]. Trotz deutlich verbesserter Diagnostik und Therapie liegt die Mortalitätsrate bei durchschnittlich bis zu 40 % [30]. Dabei spielen Komplikationen, wie gastrointestinale Blutungen, hepatische Enzephalopathie, Ileus, Schock oder renale Dysfunktion eine Rolle [28]. In einem großen Review zeigten Dever et al. 2015, dass als Erreger in ca. 55 % der Fälle Gram-negative Bakterien, v.a. *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*, in ca. 43 % der Fälle Gram-positive Bakterien, v.a. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. und *Enterococcus* spp., und in ca. 2 % der Fälle Anaerobier nachgewiesen werden können [31].

1.1.3.6 Septische Arthritis

Die septische Arthritis ist eine der Hauptverdachtsdiagnosen bei Patienten mit akuter Monoarthritis [32]. Die Inzidenz weist mit vier bis 29 Fällen auf 100.000 Personenjahren eine große Spanne auf, verantwortlich hierfür sind unterschiedliche Zahlen je nach Patientenpopulation und Vorschädigungen des betroffenen Gelenks [33]. Zu Komplikationen, wie Notwendigkeit einer Amputation, Arthrodesse oder prothetischer Versorgung und schwerwiegenden funktionellen Einschränkungen, kommt es bei 1/3 der Patienten mit septischer Arthritis, vor allem bei

alten Patienten mit vorerkrankten und/oder voroperierten Gelenken [34]. Die Mortalitätsrate liegt bei 10 bis 15 % [35]. Als Erreger kommen nahezu alle Mikroorganismen vor, die häufigsten bakteriellen Erreger sind Staphylokokken (40 %), Streptokokken (28 %), Gram-negative Stäbchen (19 %), Mykobakterien (8 %), Gram-negative Kokken (3 %), Gram-positive Stäbchen (1 %) und Anaerobier (1 %) [36].

1.1.3.7 Akute Pankreatitis

Die Ursachen für eine akute Pankreatitis sind vor allem Gallensteine und Alkoholabusus [37]. In europäischen Studien der letzten Jahre variiert die Inzidenz von 15 bis 40 pro 100.000 Menschen [38-40], die Mortalitätsrate liegt bei 1,5 bis 6,4 % [38, 40, 41]. Bei 40 bis 70 % der Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis treten Komplikationen durch Superinfektionen auf [42-44], die das Mortalitätsrisiko auf über 40 % ansteigen lassen [45]. Die häufigsten Erreger sind Gram-negative Bakterien (v.a. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp.), gefolgt von Gram-positiven Bakterien (v.a. *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*) [46-49].

1.2 Nachweismethoden in der klinischen Routine

Die mikroskopische Untersuchung von Patientenmaterialien ist eine der ältesten und trotz limitierter Sensitivität nach wie vor wichtigsten diagnostischen Methoden, die den Nachweis vieler Bakterienspezies erlaubt [50]. Die Entwicklung kultureller Methoden zum Anzüchten bestimmter Bakterien verbesserte die Nachweismöglichkeiten und schaffte zudem die Voraussetzung für eine Resistenztestung auf antimikrobielle Substanzen [51]. Auch die Serologie stellt einen festen Bestandteil der klinischen Routine dar. Sie kann ergänzend über die krankheitsspezifische Kausalität nachgewiesener Bakterien entscheiden [52].

Mit der Entwicklung von PCR-Methoden in klinischen Laboratorien begann in den 1980er Jahren die Etablierung eines neuen Standards für die Identifizierung von Bakterien [53]. Seither haben neue diagnostische Methoden die Art revolutioniert, mit der Laboratorien das große Spektrum der Erreger von infektiösen Krankheiten und deren Resistenzen identifizieren. Diese sind oftmals sensitiver, spezifischer und schneller als traditionelle Methoden [54].

1.2.1 Grenzen konventioneller Nachweismethoden

1.2.1.1 Kultur

Die konventionelle Kultur dient nach wie vor als Goldstandard in der Diagnostik bakterieller Erreger. Für leicht zu kultivierende Bakterienspezies bietet sie eine gute Sensitivität und Spezifität und die Möglichkeit der Resistenztestung [55]. Die Grenzen der Methode sind in unten stehenden Punkten dargestellt [56, 57]:

1. Es benötigt mindestens einen Tag, bis Bakterien gewachsen sind, bei anderen, z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, kann es bis zu mehreren Wochen dauern.
2. Primär nicht kultivierbare Spezies, wie z.B. *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum* und *Pneumocystis jirovecii*, können auf künstlichen Kulturmedien nicht nachgewiesen werden.
3. Nur lebende Bakterienspezies wachsen auf Kulturmedien. Proben, die nach Beginn einer Antibiotikatherapie abgenommen wurden, sind häufig in der Kultur negativ.
4. Für bestimmte Bakterienspezies bedarf es spezieller Kulturmedien, die bei fehlendem Verdacht ggf. nicht beimpft werden.

1.2.1.2 Mikroskopie/Histologie

Die Grenzen des mikroskopischen/histologischen Nachweises sind in folgenden Punkten wiedergegeben [55]:

1. Es muss eine große Anzahl an Bakterien in der Probe vorhanden sein (die Sensitivitätsgrenze der Mikroskopie liegt bei etwa 10^5 Keime/ml).
2. Es müssen geeignete Färbungen und Konditionen zum Sichtbarmachen bestimmter Bakterien gewählt werden.

1.2.1.3 Serologie

Mittels Serologie können Antikörper oder Antigene nachgewiesen werden. Der Nachweis von Antikörpern wird schwer bis unmöglich [56]:

1. in der initialen Phase einer Erkrankung, in der ggf. noch keine Antikörper gebildet wurden;
2. bei rapide verlaufenden Erkrankungen;

3. bei immunkompromittierten Patienten.
4. Generell ungeeignet ist der Nachweis von Antikörpern bei Bakterienspezies, die zur physiologischen Flora des menschlichen Körpers gehören.

Der Nachweis von Antigenen kann erschwert sein durch [55]:

1. eine zu geringe Anzahl an Bakterien in der Probe;
2. Nichtberücksichtigung komplementärer Antiseren, z.B. bei fehlender Verdachtsdiagnose.

1.2.2 Neuere molekulargenetische Nachweismethoden: PCR-Verfahren

Die PCR ist eine Enzym-gesteuerte, Primer-assoziierte und Temperatur-abhängige Methode, die der Amplifikation von DNA-Fragmenten in Proben dient [58]. Alle unterschiedlichen PCR-Verfahren beruhen auf demselben dreischrittigen Ansatz: Im ersten Schritt findet die Denaturierung der in der Probe befindlichen doppelsträngigen DNA statt, im zweiten Schritt die Primer-Hybridisierung an die nun einzelsträngig vorliegende DNA und im letzten Schritt die Elongation der komplementären DNA-Stränge durch DNA-Polymerase [58].

1.2.2.1 Targeted (singleplex) PCR

Die *targeted* PCR ist die einfachste Form der PCR [58]. Hierbei wird pro Ansatz ein spezifisches Primerpaar für eine nur bei der Gattung oder Spezies vorkommende Gensequenz verwendet, deren Nachweis angestrebt wird. In der Auswahl dieser Zielsequenz liegt der Angelpunkt für die Spezifität der *targeted* PCR. Ist erst einmal eine Nukleotidsequenz ausgemacht worden, ist es durch den öffentlichen Zugang zu großen DNA-Datenbanken heutzutage kein Problem mehr, die gegebene Sequenz auf ihre Homologie zu anderen Organismen zu überprüfen und die Spezifität zu sichern [59]. Im Hinblick auf die Sensitivität hat die *targeted* PCR durch ihre kurzen Zielsequenzen deutliche Vorteile gegenüber anderen PCR-Verfahren, vor allem der *broad-range* PCR, da die Länge der Zielsequenz negativ mit der Effektivität der Amplifikation korreliert [60]. Zudem gelten kürzere Sequenzen (100 bis 300 bp) als weniger anfällig für DNA-Abbau, der in länger lagernden Proben auftreten kann [59].

Die *targeted* PCR ist das am weitesten verbreitete PCR-Verfahren in der Diagnostik von infektiösen Krankheiten [58].

1.2.2.2 Multiplex PCR

Für die *multiplex* PCR werden zwei oder mehr Spezies-spezifische Primerpaare verwendet, sodass mehrere Bakterienspezies simultan detektiert werden können [58]. Im Vergleich zur *singleplex* PCR vereint die *multiplex* PCR viele Reaktionsvorgänge mit jeweils eigenen kinetischen Eigenschaften und eigener Effektivität in sich, die zu ganz unterschiedlichen Spezifitäten und Sensitivitäten der verschiedenen Zielsequenzen führen können [59]. Allgemein führt die Konkurrenz der Primer untereinander zu einer verringerten Sensitivität im Vergleich zur *singleplex* PCR [59]. Zusätzlich weist das PCR-Ergebnis der *multiplex* PCR ein erhöhtes Risiko für falsche Amplifikationsprodukte auf, vor allem aufgrund der Bildung von Primer-Dimeren [61]. Daher muss bei der *multiplex* PCR darauf geachtet werden, dass die Primer keine signifikante Homologie zueinander aufweisen [62]. Auch eine *hot-start* PCR kann das Risiko des Auftretens von Primer-Dimeren senken, da so die Primer-Hybridisierung bei niedrigen Temperaturen verhindert wird [63].

Liegt eine Homologie der Zielsequenzen vor, können zudem Heteroduplices entstehen, die das Ergebnis negativ beeinflussen [64, 65].

Bei dem in dieser Arbeit evaluierten GenoType PCR-Verfahren handelt es sich um eine *multiplex* PCR.

1.2.2.3 Broad-range PCR

Mithilfe der *broad-range* PCR können Bakterienspezies universell nachgewiesen werden. Sie basiert auf der Nutzung von Primerpaaren, die komplementär zu den konservierten Regionen des 16S rRNA-Gens sind, die in allen Bakterien nahezu unverändert vorliegen. Zwischen den konservierten Regionen liegen variable Regionen, die Gattungs- bzw. Spezies-spezifisch sind [58, 66] und während der PCR amplifiziert werden. Diese ermöglichen bei der anschließenden Sequenzierung die Identifikation des Bakteriums.

Der große Vorteil der *broad-range* PCR liegt in dem nahezu alle Bakterienspezies umfassenden Spektrum, wodurch vor der Untersuchung der Probe nicht entschieden werden muss, auf welche Spezies getestet werden soll [51].

Ein Nachteil der *broad-range* PCR ist, dass einige Spezies auch in den variablen Regionen des 16S rRNA-Gens nahezu identisch sind und eine ausreichende Differenzierung somit nicht möglich ist [67]. Zudem ermöglicht die anschließende

Sequenzierung keine quantitative Aussage und keine eindeutige Identifikation, wenn sich mehr als eine Spezies in der Probe befindet [66]. So leidet die Sensitivität der *broad-range* PCR im Vergleich zu den PCR-Verfahren mit schmalere Nachweisspektrum.

Bei der in dieser Arbeit als Vergleichsmethode zum GenoType herangezogenen PCR gegenüber dem Goldstandard Kultur handelt es sich um eine *broad-range* PCR.

1.2.2.4 Quantitative/Real-time PCR

Bei der quantitativen bzw. *real-time* PCR wird simultan zur Amplifikation auch eine Quantifizierung der DNA-Fragmente vorgenommen. Dabei werden zwei Formen zur Detektion von DNA unterschieden. Die eine Form beruht auf der Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffs, wie z.B. SYBR Green™, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und der Amplikon-Anzahl entsprechend Lichtsignale aussendet [58]. Die spezifischere Form ist die *real-time* PCR mit Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer-(FRET-)Sonden [66]. Hierbei werden spezifische Sonden mit Fluorophor und *quencher* verwendet, die nur dann Lichtsignale aussenden, wenn sie bei der DNA-Hybridisierung der Zielsequenz voneinander getrennt werden [68, 69]. Beide Formen vereinen Amplifikation und Fluoreszenz-Detektion in einem Schritt und in demselben *tube* und reduzieren dadurch sowohl das Kontaminationsrisiko als auch die Zeit von Amplifikation und Detektion auf bis zu unter eine Stunde [66].

1.2.3 Nachteile der PCR-Verfahren

1.2.3.1 Falsch-positive Ergebnisse

Ein großer Nachteil innerhalb der PCR-Diagnostik ist der der falsch-positiven Ergebnisse. Aufgrund der hohen Sensitivität von PCR-Verfahren können schon sehr kleine Mengen an Kontamination falsch-positive Ergebnisse verursachen [70].

Vor allem die sogenannte *carry-over* Kontamination von vorangegangenen PCR-Reaktionen mittels PCR-Reagenzien, Pipetten, *tubes* oder Laboroberflächen gilt als die vorherrschende Art der Kontamination [70]. Für diese Kontamination aus der Laborumwelt oder Reagenzien ist besonders die *broad-range* PCR anfällig, da sie universale Primer für die Zielsequenz der konservierten Regionen im

16S rRNA-Bereich von Bakterien verwendet [70]. Geschlossene Systeme minimieren das Risiko für *carry-over* Kontamination [71].

Andere falsch-positive Ergebnisse entstehen durch die Amplifikation in der Probe befindlicher humaner DNA oder der Bildung von Primer-Dimeren (s. Kapitel 1.2.2.2). Mithilfe von Schmelzkurvenanalysen können die meisten *real-time* PCR-Verfahren zumindest diese unspezifischen Amplifikationen bzw. Primer-Dimere als falsch-positive Ergebnisse entlarven [71].

Eine gute labortechnische Praxis und die Trennung von Prä- und Postamplifikationsräumen können das Kontaminationsrisiko verringern, allerdings nicht gänzlich ausschließen [70]. Zudem sind viele Methoden zur Dekontamination von PCR-Materialien bekannt. So können UV-Licht, chemische Behandlung oder enzymatische Verdauung DNA zerstören; Studien konnten aber auch hierfür keine durchschlagende Effektivität nachweisen, ohne dass gleichzeitig die Sensitivität der PCR-Verfahren darunter litt [72, 73].

1.2.3.2 Inhibition

Es gibt viele bekannte PCR-Inhibitoren, organische und anorganische, wie z.B. Calcium, Urea, Phenol, Ethanol, Polysaccharide, Huminsäure, Melanin, oder auch Proteine, z.B. Kollagen, Myoglobin, Hämoglobin, Immunglobulin G und Proteinasen [74, 75], die zu einer verminderten Sensitivität oder sogar falsch-negativen Ergebnissen führen können [76]. Sie liegen entweder bereits in den Proben vor [77, 78] oder werden während der Probenbehandlung, z.B. der DNA-Aufreinigung, eingeschleppt [79]. Die Mechanismen der Inhibition sind dabei so vielfältig wie die Substanzen und reichen von der Inhibition der reversen Transkription über die Modifikation oder den Abbau von DNA bis hin zu direkter oder indirekter Beeinträchtigung der DNA-Polymerase [76].

Kleine Amplikongrößen, höhere Schmelztemperaturen (ermöglicht durch adäquates Primer-Design) sowie höhere Konzentrationen von Reaktionssubstanzen, wie z.B. Taq oder Magnesium, können eine Inhibition unwahrscheinlicher machen [80].

1.2.3.3 Interpretation positiver Ergebnisse

Die hohe Sensitivität von PCR-Verfahren führt zu wesentlich mehr positiven Ergebnissen im Vergleich zu konventionellen Methoden [59]. Dabei machen die oben

beschriebenen falsch-positiven Ergebnisse nur einen kleinen Anteil aus. Zu der Vielzahl an positiven Ergebnissen und der dadurch zum Teil sogar als zu hoch bezeichneten Sensitivität von PCR-Verfahren führt die Tatsache, dass auch der Nachweis anzahlmäßig sehr geringer und toter Organismen gelingt, deren Pathogenität oft nicht abschließend beurteilt werden kann [81]. Nur wenige Zielsequenzen von PCR-Verfahren können tatsächlich Aussagen über die Pathogenität treffen, indem sie z.B. auf eine Toxin-codierende Gensequenz gerichtet sind [82, 83]. Es ist daher Gegenstand aktueller und zukünftiger Forschungsprojekte Methoden zu entwickeln, die den Zusammenhang zwischen detektierter Bakterienspezies und Erkrankung herstellen können [59].

1.2.4 Vorteile der PCR-Verfahren

1. PCR-Verfahren weisen eine höhere Sensitivität auf als konventionelle Methoden [59].
2. Der Nachweis gelingt auch bei sehr niedrigen DNA-Konzentrationen [84].
3. Es können auch tote Bakterien nachgewiesen werden, demnach spielt eine eventuell vorangegangene Antibiotikatherapie keine Rolle [59].
4. Bakterien können schon in der Inkubationsphase einer Krankheit nachgewiesen werden [59].
5. PCR-Verfahren erlauben in der Regel einen wesentlich schnelleren Speziesnachweis als konventionelle Methoden [58].

1.2.5 Antibiotikaresistenzen

Die Prävalenz von antibiotikaresistenten Keimen ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen [85]. Dies führt zu großen Schwierigkeiten bei der Therapie infektiöser Krankheiten [86]. Der schnelle Nachweis von Antibiotikaresistenzen detektierter Bakterienspezies ist dabei entscheidend für die zeitnahe Einleitung einer gezielten gegenüber einer empirischen Therapie [70]. Bei einigen Resistenzen ist eine eindeutige Mutation bzw. ein Resistenzgen für einen Resistenz-Phänotyp verantwortlich und eignet sich daher sehr gut für eine molekularbiologische Nachweismethode wie die PCR. Als beste Beispiele dafür sind die *mecA*-, *vanA*- und *vanB*-Gene bekannt, die für die Methicillin-Resistenz von *Staphylococcus aureus* bzw. die Vancomycin-Resistenz von

Enterokokken verantwortlich sind. Ein molekularbiologischer Nachweis dieser Gene kann in wenigen Stunden erfolgen. Im Vergleich dazu sind für einen klassischen kulturellen Nachweis ca. 48 Stunden erforderlich. Damit können molekulargenetische Verfahren einen großen Beitrag zur schnellen Therapieeinleitung und zum *outcome* der Patienten leisten [70, 87].

1.2.5.1 Methicillin-Resistenz

Als Angriffspunkt von Beta-Laktam-Antibiotika in Staphylokokken-Spezies fungieren bestimmte Enzyme, die für die Quervernetzung der Peptidoglykan-Zellwand zuständig sind. Diese haben eine hohe Affinität zu Penicillin-Antibiotika und werden Penicillin-bindende Proteine (PBP) genannt [88]. Die Methicillin-Resistenz von Staphylokokken-Spezies beruht auf einem speziellen Penicillin-bindenden Protein, dem PBP2a, das wegen der geringen Affinität zu Beta-Laktam-Antibiotika zu einer Resistenz gegenüber den Vertretern dieser Substanzklasse führt [89]. Die Expression von PBP2a wird über das *mecA*-Gen vermittelt [88].

Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist einer der häufigsten Erreger schwerer nosokomial erworbener Infektionen [90]. Verlässliche Resistenzbestimmungen können einen wichtigen Beitrag dazu leisten die weitere Ausbreitung von MRSA zu limitieren [91]. Durch ihre hohe Sensitivität und Spezifität stellen PCR-Verfahren zum Nachweis von *mecA* eine solche verlässliche Identifikationsmethode für MRSA dar [92].

1.2.5.2 Vancomycin-Resistenz

Den Angriffspunkt für Vancomycin bilden endständige D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen des bakteriellen Zellwandbestandteils Murein, an die Vancomycin bindet und dadurch ähnlich den Beta-Laktam-Antibiotika die Quervernetzung der Peptidoglykan-Zellwand von Gram-positiven Bakterienspezies verhindert [93]. Resistenzen gegenüber Vancomycin existieren dabei in einigen *Enterococcus*-Spezies, die diese D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen durch andere ersetzt haben, an die Vancomycin nicht binden kann. Bisher wurden neun Gencluster entdeckt, die dafür verantwortlich sind: *vanA*, *vanB*, *vanD* und *vanM* codieren für den Ersatz der D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen durch D-Alanyl-D-Lactat-Gruppen; *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* und *vanN* für den Ersatz der D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen durch D-Alanyl-D-Serin-Gruppen [94]. Darunter sind *vanA*

und *vanB* die Genotypen von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE), die vor allem bei *Enterococcus faecium* und zu einem wesentlich geringeren Teil bei *Enterococcus faecalis* zu finden sind [95]. Die steigende Prävalenz von VRE-assoziierten Erkrankungen sowie die Fähigkeit der Übertragung der Resistenz auf andere Bakterienspezies (wie *Staphylococcus aureus*) belegen die Notwendigkeit schneller und verlässlicher Methoden zum Nachweis Vancomycin-resistenter Enterokokken [96].

1.3 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war eine Evaluation des GenoType-Verfahrens zum Nachweis bestimmter Bakterienspezies und deren Resistenzgene mittels *multiplex* PCR und anschließender reverser Hybridisierung. Hierfür wurden die diagnostische Sensitivität und Spezifität des Tests aus primär sterilen Patientenmaterialien ermittelt. Die Kulturdiente als Goldstandard. Als Vergleichsmethode wurde die konventionelle 16S *broad-range* PCR herangezogen. Im Vorhinein wurde das GenoType-Verfahren nur in der Sepsis-Diagnostik bei positiven Blutkulturen verwendet, es existierten keine publizierten Daten über die Verwendung der Methode für primär sterile Proben.

2 Material und Methoden

2.1 Proben

Als Proben wurden Patientenmaterialien zufällig ausgewählt, die in dem Zeitraum zwischen November 2013 und Juni 2014 in die Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene eingingen. Voraussetzung für geeignete Proben war der Entnahmezeitpunkt vor weniger als 48 Stunden sowie die Herkunft aus primär sterilen Kompartimenten des Körpers. Die Proben wurden weder selektiert noch spielten klinische Daten in dieser Studie eine Rolle.

Insgesamt wurden so 196 Proben getestet, davon 151 Punktate (54 Pleura-Punktate, 26 Punktate aus dem Bauchraum, 21 Liquor-Punktate, 14 Gelenk-Punktate und acht Punktate aus Perikard oder Mediastinum sowie 27 Punktate aus sonstigen Körperstellen) und 45 Gewebeproben (20 Gewebeproben von Gelenken und knöchernen Strukturen, fünf von Dura mater, vier von Pleura, jeweils zwei von Herz, Pankreas und Lymphknoten sowie 11 weitere intraoperativ steril entnommene Gewebeproben aus verschiedensten Kompartimenten). Eine Übersicht über die Herkunft der Proben (ohne Differenzierung zwischen Punktate oder Gewebeprobe) bietet Tabelle 1.

Tabelle 1: **Herkunft der Proben**

Probenmaterial/Entnahmestelle	Anzahl
Pleura	58
Gelenke und knöcherne Strukturen	34
Abdomen	28
Liquor	21
Herzklappen/Perikard/Mediastinum	10
Dura mater	5
Lymphknoten	2
sonstige	38
gesamt	196

2.1.1 Ethische Prüfung

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf begutachtet und mit der Studiennummer 4445 versehen.

2.2 Materialien

Für die gesamte Studie wurden laborübliche Desinfektionsmittel, DNA-Dekontaminationsmittel (DNA-Exitus), *tubes*, Pipetten, sterile Pipettenspitzen mit Filter, Kühlracks, Tischzentrifugen, sterile und unsterile Handschuhe, steriles Wasser, Vortexer und Zeitmesser verwendet. Spezielle Geräte und Substanzen sind im Folgenden aufgeführt.

2.2.1 GenoType

2.2.1.1 GenoType BacExtract

Alle Pipettierschritte des BacExtract-Protokolls wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Als Thermomixer diente der Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg). Es wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Substanzen verwendet.

Tabelle 2: **Reagenzien des GenoType BacExtract** (Firmenangaben)

Reagenzien	Bestandteile
CM	> 50 % Guanidinhydrochlorid, < 2,5 % Tris
DB1	Puffersubstanz, < 5 % Magnesiumsalz
M-DNase B	DNase, Puffersubstanz
RS	Puffersubstanz, < 5 % EDTA
RL	> 50 % Saccharose, < 1 % Tris, < 1 % EDTA
BugLysis	muralytische Enzyme, Puffersubstanz
RP	< 2 % SDS, < 1 % Tris, < 1 % EDTA, < 1 % Calciumchlorid
Proteinase K	1 % Proteinase K
CS	> 50 % Guanidinthiocyanat
AB	< 80 % Isopropanol, 2-10 % Tris
WB	< 40 % Isopropanol, 2-10 % EDTA
WS	< 70 % Ethanol
ES	Puffersubstanz
SU	Puffersubstanz
PKB	Proteinase K-Puffer
Enzyme K	Enzym K

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

2.2.1.2 *GenoType multiplex PCR*

Die Herstellung des Master-Mix erfolgte in einem kontaminationsfreien Arbeitsraum unter einer Sicherheits-Werkbank der Klasse 2 (s.o.). Pro Probe wurden 35 µl Primer-Nucleotid-Mix, 10 µl 5-fach PCR Puffer und 0,7 µl M-Taq (Taq-Polymerase) verwendet.

Die PCR wurde auf dem GTQ-Cycler 96 (Hain Lifescience, Nehren) durchgeführt.

2.2.1.3 *GenoType Bac-IDent*

Die DNA-Detektion wurde auf dem TwinCubator (Hain Lifescience) mit in Tabelle 3 aufgeführten Reagenzien durchgeführt. Außerdem wurden Inkubationswannen mit zwölf Kavitäten, Bac-IDent-STRIPS (Membranstreifen) sowie eine Schablone zum Ablesen der Membranstreifen (alles Hain Lifescience) verwendet.

Tabelle 3: Reagenzien GenoType Bac-IDent

Reagenzien	Bestandteile
Denaturierungsreagenz (B-DEN)	< 2 % NaOH, Farbstoff
Hybridisierungspuffer (HYB)	8-10 % anionisches Tensid, Farbstoff
Stringent-Waschlösung (STR)	> 25 % einer quartären Ammoniumverbindung, < 1 % anionisches Tensid, Farbstoff
Rinse-Lösung (RIN)	< 1 % NaCl, < 1 % anionisches Tensid
Konjugat-Konzentrat (CON-C)	Streptavidin-konjugierte Alkalische Phosphatase, Farbstoff
Konjugat-Puffer (CON-D)	Puffersubstanz, 1 % Blocking-Reagenz, < 1 % NaCl
Substrat-Konzentrat (SUB-C)	Dimethylsulfoxid, Substratlösung
Substrat-Puffer (SUB-D)	Puffersubstanz, < 1 % MgCl ₂ , < 1 % NaCl

NaOH: Natriumhydroxid, NaCl: Natriumchlorid, MgCl₂: Magnesiumchlorid

2.2.2 16S/18S *broad-range* PCR

2.2.2.1 DNA-Aufreinigung mittels Bio Robot EZ 1

Die Inkubation der Proben mit Proteinase K erfolgte auf einem Heizblock der Firma Bioer Technology (Hangzhou, China). Bei dem automatisierten DNA-Aufreinigungsgerät handelte es sich um den Bio Robot EZ1, der mit den entsprechenden Kartuschen (beides QIAGEN, Hilden) bestückt wurde.

2.2.2.2 Broad-range PCR

Auch für die *broad-range* PCR wurden die Master-Mixe im kontaminationsfreien Reinraum unter einer Sicherheits-Werkbank der Klasse 2 hergestellt. Es wurden pro Probe 37,5 µl 2-fach MESA GREEN™ (Eugentecs, Köln), 0,6 µl Primer *forward* (100 µM), 0,6 µl Primer *reverse* (100 µM) (beide MWG Biotech, Sequenzen s. Tabelle 4) und 21,3 µl *aqua dest.* verwendet, die wie in Tabelle 5 aufgeführt zusammengesetzt wurden.

Tabelle 4: **Primer der *broad-range* PCR**

Target	Primer/ Sonde	Sequenz	Hersteller
16S rDNA 500 bp	16S-for	AGAGTTTGATCNTGGYTCAG	MWG/Metabion
	16S-rev1	GWATTACCGCRGCKGCTG	MWG/Metabion
16S rDNA 900 bp	16S-for	AGAGTTTGATCNTGGYTCAG	MWG/Metabion
	16S-rev2	CCGTGAATTCHTTTRAGTTT	MWG/Metabion
18S rRNA	18S-for	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	MWG/Metabion
	18S-rev	TCCTCCGCTTATTGATATGC	MWG/Metabion

rDNA: ribosomale *deoxyribunucleic acid*, bp: Basenpaare, rRNA: ribosomale *ribonucleic acid*, for: *forward*, rev: *reverse*

Tabelle 5: **Zusammensetzung der *broad-range* PCR Master-Mixe pro PCR-Ansatz**

	16S 500 bp	16S 900 bp	18S
2-fach Mesa Green™	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Primer-for (100 µM)	0,2 µl 16S-for	0,2 µl 16S-for	0,2 µl 18S-for
Primer-rev (100 µM)	0,2 µl 16S-rev1	0,2 µl 16S-rev2	0,2 µl 18S-rev
aqua dest.	7,1 µl	7,1 µl	7,1 µl

for: *forward*, rev: *reverse*, dest: *destillata*, bp: Basenpaare, µM: Mikromolar, µl: Mikroliter

Die PCR wurde auf dem IQ5 (Bio-Rad, München) durchgeführt.

2.2.2.3 Amplifikat-Aufreinigung

Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte mittels NucleoSpin PCR *clean-up*-Protokoll. Hierfür wurden pro Probe 120 µl *binding buffer* NTI, 700 µl *wash buffer* NT3 (2x) und 18 µl *elution buffer* NE verwendet.

Zur Messung der DNA-Konzentration in positiven Proben wurde der NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) verwendet.

2.2.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Amplifikate erfolgte nach der Sanger-Methode im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.3 Methoden

Alle Proben wurden routinemäßig auf Kulturmedien (als Goldstandard) geimpft sowie speziell aufbereitet und sowohl dem *line-blot*-Verfahren des GenoType Bac-IDent als auch der 16S/18S *broad-range* PCR mit anschließender Sequenzierung nach Sanger unterzogen. Zur DNA-Aufreinigung wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Zum einen die auf reverser Hybridisierung basierende DNA-Aufreinigung mittels GenoType BacExtract, zum anderen eine Magnet-Partikel-Aufreinigung mittels Bio Robot EZ1.

2.3.1 GenoType

Bei dem GenoType-Verfahren handelt es sich um ein dreischrittiges Verfahren zur Detektion von den in Tabelle 6 aufgeführten sechs Gram-positiven und acht Gram-negativen Bakterienspezies und den drei Resistenzgenen *mecA*, *vanA* und *vanB*. Im ersten Schritt wird die in der Probe befindliche DNA aufgereinigt, im zweiten Schritt mittels *multiplex* PCR amplifiziert und im dritten Schritt mittels reverser Hybridisierung und *line-blot* detektiert.

Tabelle 6: Liste der mittels GenoType *multiplex* PCR detektierbaren Bakterienspezies und Resistenzgene

Bande	Gram-positiv (6)
3	<i>Staphylococcus aureus</i>
4	<i>Staphylococcus epidermidis/capitis/caprae</i>
5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
6	<i>Streptococcus milleri</i> Gruppe
7	<i>Enterococcus faecalis</i>
8	<i>Enterococcus faecium</i>
Gram-negativ (8)	
9	<i>Escherichia coli/Shigella</i> spp.
10	<i>Salmonella enteritidis/Typhimurium</i>
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
13	<i>Klebsiella oxytoca</i>
14	<i>Proteus mirabilis</i>
15	<i>Serratia marcescens</i>
16	<i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i>
Resistenzgene	
17	<i>mecA</i>
18	<i>vanA</i>
19	<i>vanB</i>

Bande 3-19: Lokalisation auf den Membranstreifen

2.3.1.1 DNA-Aufreinigung mittels GenoType BacExtract

Die Methode des GenoType BacExtract beruht auf einer zweifachen Aufreinigung. In einem vorangestellten Vorgang folgt auf die enzymatische Lyse von Zellmembranen die Verdauung der freigesetzten humanen DNA durch DNase. So wird die in der Probe befindliche humane DNA zersetzt und kann das Verfahren nicht stören. Anschließend werden die zunächst durch ihre Zellwand geschützten Bakterien lysiert und die bakterielle DNA zur Analyse freigesetzt.

2.3.1.1.1 Spezielle Probenaufbereitung

Eine spezielle Probenaufbereitung wurde nur dann notwendig, wenn bei Proben von Körperflüssigkeiten nicht genug Ausgangsmaterial vorhanden war oder es sich um Gewebe handelte. Bei zu geringem Ausgangsmaterial wurde das Probenmaterial mit

1 ml SU-Puffer aufgefüllt und anschließend gut durchmischt. Handelte es sich um Gewebe, wurde ein repräsentatives etwa 0,25 cm² großes Gewebestück präpariert, mit 180 µl PKB-Puffer und 20 µl Enzyme K in einem *sample tube* vermischt und bei 56 °C für 10 Minuten unter Schütteln im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die vorbehandelte Probe mit 800 µl der Transportflüssigkeit oder 800 µl SU-Puffer aufgefüllt.

2.3.1.1.2 Lyse humaner Zellen und Entfernung humaner DNA

Zur Lyse humaner Zellmembranen wurden zunächst je 1 ml Probe (ggf. speziell aufbereitet, s. Kapitel 2.3.1.1.1) für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 250 µl CM-Puffer versetzt. Die Zugabe von 250 µl DB1-Puffer sowie 10 µl M-DNase B und eine erneute Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur dienten dem Abbau der zuvor freigelegten humanen DNA. Nach einer anschließenden 10-minütigen Zentrifugation (10.000 x g, für jede Zentrifugation verwendet) wurde der mit humanen Zellresten bestückte Überstand vorsichtig entfernt und die verbleibenden Pellets jeweils mit 1 ml RS-Puffer resuspendiert. Der Vorgang wurde nach 5 Minuten Zentrifugation wiederholt, wobei die Resuspendierung der Pellets diesmal mit 80 µl RL-Puffer durchgeführt wurde, um erneut zurückgebliebene, weniger dichte Zellbestandteile von der DNA zu trennen.

2.3.1.1.3 Lyse bakterieller Zellen und Denaturierung von Proteinen

Im Anschluss wurden die Proben mit 20 µl Bug-Lysis-Lösung versetzt und unter kontinuierlichem Schütteln für 30 Minuten im Thermomixer bei 37 °C inkubiert, um nun die bakteriellen Zellwände aufzuschließen und die bakterielle DNA freizusetzen. Zur Denaturierung der Proteine wurden daraufhin 150 µl RP-Puffer sowie 20 µl Proteinase K hinzugegeben und die Inkubation diesmal für 10 Minuten bei 56 °C unter Schütteln im Thermomixer durchgeführt.

2.3.1.1.4 Extraktion der bakteriellen DNA

Nach Zugabe von 250 µl CS-Puffer sowie 250 µl AB-Puffer wurde der gesamte *sample tube*-Inhalt in *spin columns* auf *collection tubes* pipettiert. Während der folgenden 30-sekündigen Zentrifugation wurden Proteine und andere Verunreinigungen ausgewaschen, während DNA-Moleküle an die Silikamembran gebunden wurden.

Anschließend wurden die *spin columns* entnommen und in neue *collection tubes* gegeben. Durch die Zugabe von 400 µl WS-Puffer und erneuter 3-minütiger Zentrifugation konnten letzte durch die Puffer zugegebene chaotrope Salze aus der Membran ausgewaschen werden. Daraufhin wurden die *spin columns* aus den *collection tubes* herausgenommen und in *elution tubes* umgesteckt. Je 100 µl von auf 70 °C erhitztem ES-Puffer wurden dann in die *spin columns* pipettiert und alles 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch konnte das Lösen der bakteriellen DNA von der Silikamembran erreicht werden. Abschließend folgte eine 1-minütige Zentrifugation. In den *elution tubes* befand sich nun je etwa 100 µl Eluat, das für die Weiterbearbeitung am gleichen Tag bei 8 °C oder an anderen Tagen bei -20 °C gelagert wurde.

2.3.1.2 DNA-Amplifikation mittels GenoType multiplex PCR

Bei der GenoType PCR handelt es sich um eine *multiplex* PCR mit 17 verschiedenen Primern, die komplementär zu Ziel-Oligonukleotid-Sequenzen von den in Tabelle 6 aufgeführten sechs Gram-positiven und acht Gram-negativen Bakterienspezies sowie den Resistenzgenen *mecA*, *vanA* und *vanB* sind. Die Primer sind mit Biotin markiert, das im anschließenden Schritt der DNA-Detektion den Nachweis der Amplifikate durch einen enzymatischen Farbumschlag ermöglicht (s. Kapitel 2.3.1.3).

2.3.1.2.1 Herstellung des PCR-Ansatzes

Oben genannte Reagenzien wurden gekühlt (da es sich bei der M-Taq um eine *hot-start* Polymerase handelt) der Probenanzahl entsprechend zu einem Master-Mix angesetzt und anschließend jeweils 45 µl mit 5 µl Probe in PCR-*tubes* pipettiert. Bei jedem Ansatz wurde jeweils eine Negativkontrolle (*aqua dest.*) sowie eine Positivkontrolle (*Klebsiella oxytoca*-DNA) mitgeführt.

2.3.1.2.2 PCR-Protokoll

Das PCR-Programm wurde wie im Folgenden beschrieben im Thermocycler durchgeführt:

Ein Zyklus bei 95 °C für 3 Minuten und 10 Zyklen bestehend aus nachstehenden zwei Phasen: 95 °C für 30 Sekunden sowie 58 °C für 2 Minuten; danach 25 Zyklen bestehend aus folgenden drei Phasen: 95 °C für 25 Sekunden, 53 °C für 40 Sekunden und 70 °C für ebenfalls 40 Sekunden; und zum Schluss 70 °C für 8 Minuten.

Anschließend wurden die Amplifikate direkt dem GenoType Bac-IDent-Protokoll unterzogen oder bei 8 °C gelagert.

2.3.1.3 DNA-Detektion mittels GenoType Bac-IDent

Das Bac-IDent-Verfahren basiert auf einer DNA-Membranstreifen-Technologie (*line-blot*), bei der die mit Biotin markierten Amplifikate über eine reverse Hybridisierung an komplementäre Sonden auf einem Membranstreifen gebunden und anschließend von Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase farblich sichtbar gemacht werden.

2.3.1.3.1 Denaturierung und reverse Hybridisierung der Amplifikate an die Sonden

Zunächst wurden die Rinselösung, der Konjugat-Puffer und der Substrat-Puffer auf Raumtemperatur, die Hybridisierungslösung und die Stringentlösung im Wasserbad auf 45 °C vorgewärmt sowie der TwinCubator zum ebensolchen Aufwärmen gestartet. Außerdem wurden 1:100-Verdünnungen des Konjugat-Konzentrats und des Substrat-Konzentrats mit den jeweiligen Puffern CON-D und SUB-D hergestellt.

Zur Denaturierung der amplifizierten DNA wurden 20 µl Amplifikat und 20 µl Denaturierungslösung jeweils in die unteren Abschnitte der Wannenkavitäten pipettiert, gut gemischt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden jeweils 1 ml der vorgewärmten Hybridisierungslösung in die Kavitäten pipettiert, die Wanne so lange geschwenkt, bis die Lösung eine homogene Farbe erhielt, und danach in jede Kavität ein zuvor unten nummerierter Membranstreifen gelegt. In den folgenden 30 Minuten bei 45 °C im TwinCubator erfolgte in den Wannenkavitäten die Hybridisierung der biotinmarkierten Amplifikate an die DNA-Sonden der Membranstreifen. In der Folge wurde die Hybridisierungslösung vollständig entfernt und durch jeweils 1 ml vorgewärmte Stringentlösung ersetzt. Während der anschließenden 15 Minuten unter leichtem Schütteln bei 45 °C im TwinCubator wurden unspezifisch an die Sonden gebundene Amplifikate gelöst und durch vollständiges Abkippen der Stringentlösung ausgewaschen. Die darauffolgende Zugabe von 1 ml Rinselösung, das Schütteln für eine Minute im TwinCubator und erneutes Abkippen diente der Entfernung der Stringentlösung, womit mögliche störende Interaktionen bei der Konjugatbindung verhindert werden sollten.

2.3.1.3.2 Konjugatbindung und enzymatische Farbreaktion

Nach der Hybridisierung der Amplifikate an die Sonden schloss sich die Zugabe von je 1 ml verdünntem Konjugat zu jedem in einer Kavität liegenden Membranstreifen an. In den folgenden 30 Minuten im TwinCubator band die so zugegebene alkalische Phosphatase über das konjugierte Streptavidin an die mit Biotin markierten Amplifikate. Danach wurden die Membranstreifen zweimal je 1 Minute mit 1 ml Rinselösung und einmal mit 1 ml *aqua dest.* auf dem TwinCubator gewaschen. Jetzt erfolgte die Zugabe von 1 ml verdünntem Substrat in jede Kavität mit anschließender lichtgeschützter Lagerung. An den Banden, an denen eine Hybridisierung eines Amplifikats an eine Sonde stattgefunden hatte, setzte die alkalische Phosphatase innerhalb von 3 bis 10 Minuten das zur Detektion zugegebene Substrat in einen Farbstoff um, der auf den Membranstreifen als Farbniederschlag sichtbar wurde. Bei deutlichem Hervortreten des Farbniederschlags in Form von Banden wurde die Substratreaktion durch zweimaliges Waschen mit *aqua dest.* gestoppt und die Membranstreifen zum Trocknen auf saugfähiges Papier gelegt.

2.3.1.3.3 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Membranstreifen erfolgte anhand einer Schablone auf einem Auswertungsbogen (exemplarische Darstellung in Abbildung 1). Dabei konnte das Testergebnis als valide angesehen werden, wenn CC- und AC-Bande entwickelt waren und damit die Effizienz von Konjugatbindung und Substratreaktion gegeben war (CC-Bande) und das während der Amplifikation entstandene Kontrollprodukt an die Amplifikationskontrollzone gebunden hatte (AC-Bande).

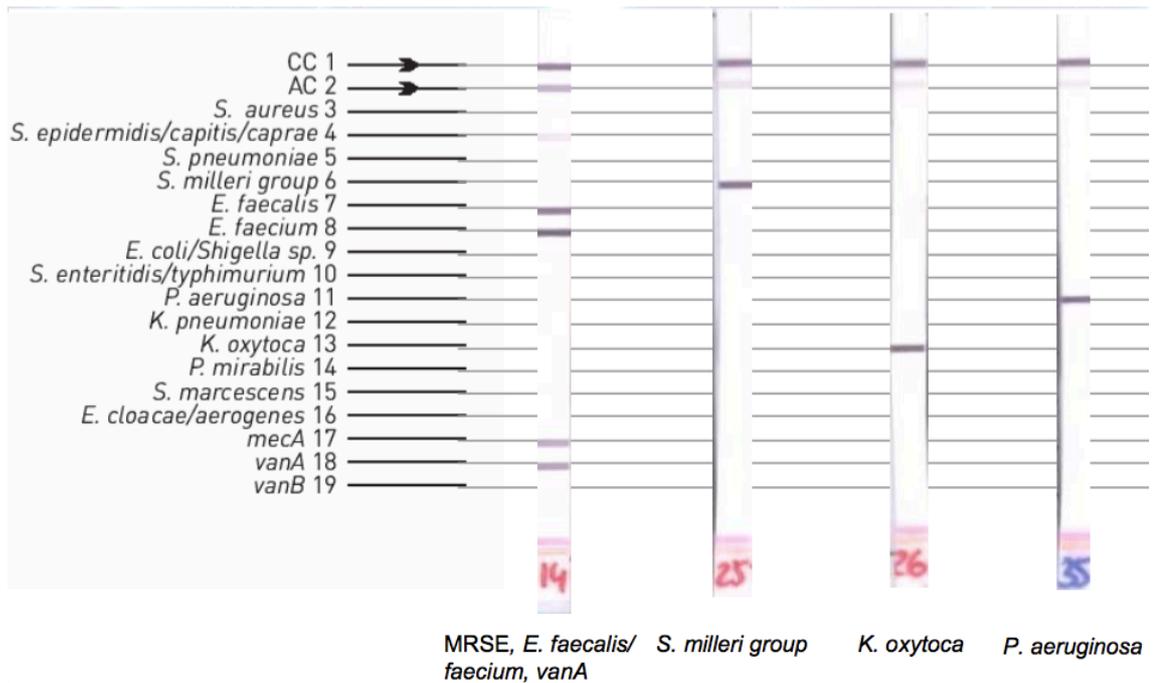


Abb. 1: Beispiele für die Auswertung der Membranstreifen des GenoType Bac-IDent anhand entsprechender Schablone (Quelle: Hain Lifescience, Nehren)

CC: Konjugatkontrolle, AC: Amplifikationskontrolle, 3-16 Bakterienspezies, 17-19 Resistenzgene, MRSE: methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis*, E.: *Enterococcus*, S.: *Streptococcus*, K.: *Klebsiella*, P. *Pseudomonas*

Die Banden 3 bis 19 gaben Auskunft über die Detektion der in Tabelle 6 aufgeführten Bakterienspezies und deren Resistenzgene. Dabei wurde eine Bande nur dann als positiv gewertet, wenn ihre Intensität gleich stark oder stärker war als die der Amplifikationskontrolle.

2.3.2 16S/18S broad-range PCR

2.3.2.1 DNA-Aufreinigung mittels Bio Robot EZ1

Bei der DNA-Aufreinigung mittels Bio Robot EZ1 werden die Zellen zunächst lysiert und die freie DNA anschließend durch Bindung an Magnet-Partikel gewaschen, aufgereinigt und eluiert.

2.3.2.1.1 Probenvorbereitung

Sowohl Punktate als auch Gewebestücke wurden zunächst unter Zugabe von 10 µl Proteinase K bzw. bei Gewebeproben zusätzlicher Zugabe von 190 µl G2-Puffer bei 56 °C für eine Stunde im Heizblock inkubiert und die Zelllyse in Gang gesetzt.

2.3.2.1.2 Automatisierte Aufreinigung

Die Aufreinigung erfolgte hier nach Angaben des Herstellers. In Kürze: 200 µl Probe wurden in 2 ml *sample tubes* pipettiert und nach Bestückung des Bio Robot EZ1 mit den entsprechenden Kartuschen dem voreingestellten Programm unterzogen. Das Eluat-Volumen betrug 50 µl.

2.3.2.2 DNA-Amplifikation mittels 16S/18S broad-range PCR

Bei der *broad-range* PCR handelt es sich um eine *real-time* PCR, deren DNA-Amplifikationsnachweis auf der Einlagerung von SYBR Green™ in doppelsträngige DNA und dessen Fluoreszenz-Messung basiert.

2.3.2.2.1 Herstellung des PCR-Ansatzes

Mit den unter Kapitel 2.2.3 genannten Reagenzien wurden jeweils 20 µl des entsprechenden Master-Mix mit 5 µl Probe in PCR-*tubes* pipettiert. Bei jedem Ansatz wurden je einmal 5 µl *aqua dest.* als Leerprobe und einmal 5 µl *Escherichia coli*-DNA als Positivkontrolle mitgeführt.

2.3.2.2.2 PCR-Protokoll

Das Amplifikationsprofil der *broad-range* PCR im IQ5 beinhaltet folgende Schritte:

Thermische Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch 2-minütiges Erhitzen auf 94 bis 95 °C; 35 Zyklen zur Amplifizierung der DNA bei jeweils 30-sekündiger Denaturierung bei 95 °C, Primeranlagerung durch 30-sekündiges Abkühlen des Ansatzes auf 55 °C und Synthetisierung des komplementären Stranges in 1 Minute bei 72 °C; abschließende Schmelzkurvenanalyse durch einmalige Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden und Abkühlung auf 60 °C mit anschließenden 61 Zyklen, in denen die Temperatur des 15-sekündigen Abkühlungsschrittes kontinuierlich um 0,5 °C pro Zyklus von 60 auf 95 °C erhöht wird.

2.3.2.2.3 Beurteilung positiver Ergebnisse

Eine Probe wurde dann als positiv gewertet, wenn eine Amplifikationskurve vorhanden war, die Schmelztemperatur zwischen 85 bis 92 °C lag und die Peakhöhe der Schmelzkurve über 900 RFU betrug. Lag die Schmelztemperatur bei 82 bis 83 °C, wurde diese Probe als negativ gewertet, da es sich bei dieser Schmelztemperatur um Amplifikate humaner DNA handelt.

2.3.2.3 Spezies-Detektion

2.3.2.3.1 Amplifikat-Aufreinigung mittels NucleoSpin

Die als positiv bewerteten Amplifikate wurden mit dem NucleoSpin PCR *clean-up*-Protokoll aufgereinigt: Zunächst wurden je 25 µl Amplifikat mit 50 µl NT I Buffer gemischt. Dieses Gemisch wurde in ein *clean-up column* auf einem *collection tube* pipettiert und durch 30-sekündige Zentrifugation (11.000 x g, für jede Zentrifugation verwendet) erfolgte die DNA-Bindung an die Silika-Membran. Nach Verwerfen des Rückstandes und Umstecken in ein weiteres *collection tube* wurden daraufhin 700 µl NT 3 Buffer auf die Silika-Membran pipettiert und erneut 30 Sekunden zentrifugiert. Dies diente dem Waschen der Silika-Membran. Daraufhin wurde erneut das *collection tube* verworfen und das *clean-up column* in ein weiteres *collection tube* umgesteckt. Es schloss sich das Trocknen der Silika-Membran durch 1-minütige Zentrifugation an. Die DNA-Elution erfolgte schließlich durch das Umstecken des getrockneten *clean-up columns* in ein *microcentrifuge tube*, Zugabe von 18 µl NE Buffer, 1-minütige Intubation bei Raumtemperatur und abschließende 1-minütige Zentrifugation.

2.3.2.3.2 Messung der Amplifikat-Konzentration

Zur Messung der DNA-Konzentration wurde das Programm *nucleic acid* auf dem NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer verwendet. Dazu wurden je 1 µl der aufgereinigten DNA des PCR-Produktes auf das Ende einer Glasfaseroptik gegeben und mit einer weiteren Glasfaseroptik in Kontakt gebracht. Die photometrische Messung erfolgt hierbei durch das Aussenden eines Xenonlichtes und dessen spektrometrische Analyse nach Durchlaufen der Probe. Für die Sequenzierung sollte eine DNA-Konzentration von 15 ng/µl bestehen, sodass die Amplifikate ggf. im Anschluss der gemessenen Konzentration entsprechend mit Elutionspuffer verdünnt wurden.

2.3.2.3.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung zur Spezies-Identifikation wurde im BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach der Sanger-Methode durchgeführt.

2.3.2.3.4 Datenbankanalyse

Die Analyse der übermittelten DNA-Sequenzen erfolgte über eine Datenbankrecherche auf www.ncbi.nlm.nih.gov/blast mit dem Programm *nucleotide blast*. Die Identifizierung der Bakterienspezies ergab sich aus dem Grad der Übereinstimmung mit den hinterlegten Sequenzen. Dabei galt eine Homologie von ≥ 95 % als ausreichend.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse GenoType Bac-IDent

Von 196 getesteten Proben detektierte der GenoType in 71 (36,2 %) ein oder mehrere Bakterienspezies: in 44 Proben (22,4 %) detektierte der GenoType eine Bakterienspezies, in 19 Proben (9,7 %) zwei, in sechs Proben (3,1 %) drei und in zwei Proben (1 %) vier Bakterienspezies. 119 Proben (60,7 %) waren negativ und sechs (3,1 %) inhibiert; letztere wurden auch als negativ gewertet. Die numerische Verteilung der nachgewiesenen Bakterienspezies in absteigender Anzahl aufgelistet war wie folgt: *Escherichia coli/Shigella* spp. 22 (11,2 %), *Enterococcus faecium* 19 (9,7 %), *Staphylococcus aureus* 14 (7,1 %), *Enterococcus faecalis* 12 (6,1 %), *Klebsiella oxytoca* 9 (4,6 %), *Klebsiella pneumoniae* 8 (4,1 %), *Staphylococcus epidermidis/capitis/caprae* 7 (3,6 %), *Proteus mirabilis* 5 (2,6 %), *Enterobacter cloacae/aerogenes* 4 (2 %), *Streptococcus pneumoniae* 3 (1,5 %), *Pseudomonas aeruginosa* 3 (1,5 %), *Streptococcus milleri* Gruppe 2 (1 %). Zusätzlich wies der GenoType 13 Mal (6,6 %) das Resistenzgen *mecA* nach sowie jeweils zweimal (je 1 %) *vanA* und *vanB*. Tabelle 7 bietet hierüber noch einmal eine übersichtliche Darstellung.

Tabelle 7: Anzahl der einzelnen Spezies und Resistenzgene unter den positiven Ergebnissen des GenoType

Spezies	Anzahl detektiert durch GT	Kulturergebnis	
		identisch** N (%)	diskrepant*** N (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	11 (78,6)	3 (21,4)
<i>Staphylococcus epidermidis/capitis/caprae</i>	7	4 (57,1)	3 (42,9)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	1 (33,3)	2 (66,7)
<i>Streptococcus milleri</i> Gruppe	2	2 (100)	0 (0)
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	4 (33,3)	8 (66,7)
<i>Enterococcus faecium</i>	19	4 (21,1)	15 (78,9)
<i>Escherichia coli/Shigella</i> spp.	22	9 (40,9)	13 (59,1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	3 (100)	0 (0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	3 (37,5)	5 (62,5)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9	0 (0)	9 (100)
<i>Proteus mirabilis</i>	5	2 (40)	3 (60)
<i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i>	4	1 (33,3)	3 (66,7)
gesamt	108	44 (40,7)	64 (59,3)
Resistenzgene	Anzahl GT (davon plausibel*)	Kulturergebnis	
		identisch** N (%)	diskrepant*** N (%)
<i>mecA</i>	13 (7)	2 (15,4)	11 (84,6)
<i>vanA</i>	2 (2)	1 (50)	1 (50)
<i>vanB</i>	2 (2)	1 (50)	1 (50)
gesamt	17 (11)	4 (23,5)	13 (76,5)

GT: GenoType

*Nachweis des Resistenzgens bei Bakterienspezies, die dieses Merkmal ausprägen können

**Kultur-Ergebnis und GenoType-Ergebnis übereinstimmend

***Kultur-Ergebnis und GenoType-Ergebnis nicht übereinstimmend

3.2 Vergleich GenoType Bac-IDent zu Kultur

GenoType und Kultur zeigten 150 (79,1 %) gleichartige Analysen, wobei 39 Proben (19,9 %) bei beiden positiv und 111 (56,6 %) bei beiden negativ waren. In 46 Fällen unterschieden sich die Probenanalysen völlig voneinander: Die Kultur zeigte ein

Ergebnisse

positives Ergebnis in 19 Proben (9,7 %), in denen der GenoType keine oder eine andere Bakterienspezies detektierte, wobei hier zwei auf Kulturmedium gewachsene Spezies nicht im Spektrum des GenoType enthalten waren; in 27 Proben (13,8 %) fand der GenoType eine oder mehrere Bakterienspezies, bei denen die Kultur negativ blieb (s. auch Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse von GenoType und Kultur

		Kultur		
		+	-	gesamt
GenoType	+	39 (19,9 %)	27 (13,8 %)	66
	-	19 (9,7 %)	111 (56,6 %)	130
gesamt		58	138	196

Von den 39 (19,9 %) bei beiden positiven Ergebnissen waren 23 (59 %) deckungsgleich. In 16 (41 %) der 39 Proben detektierten Kultur und GenoType eine oder mehrere identische Spezies, aber der GenoType in zehn Proben (62,5 %) zusätzlich eine Bakterienspezies mehr, in drei Proben (18,8 %) zwei mehr und in einer Probe (6,3 %) drei mehr sowie in zwei Proben (12,5 %) eine weniger als die Kultur.

Bei fünf Proben unterschieden sich GenoType und Kultur in ihrem Speziesnachweis völlig voneinander, sodass wir diese als falsch-positive Ergebnisse des GenoType werteten und sich die Anzahl der diskrepanten Probenanalysen auf 46 (23,5 %) belief.

Von den 17 im GenoType detektierten Resistenzgenen waren sechs (35,3 %) nicht plausibel, da hier die Bande für das *mecA*-Gen positiv war, allerdings keine Staphylokokken nachgewiesen wurden. Die elf in sich plausiblen Ergebnisse (64,7 %) wurden vier Mal (23,5 %) von den Resistenzbestimmungen der Kultur bestätigt und somit als richtig-positiv gewertet. Vier (23,5 %) der elf plausiblen Resistenzgennachweise waren diskrepant zur Kultur. Drei Resistenzgennachweise des GenoType (27,3 %) konnten nicht beurteilt werden, da bei diesen Proben in der Kultur zwei Mal aus klinischen Gründen keine Resistenzbestimmung durchgeführt wurde und einmal auf Kulturmedium keine Spezies gewachsen war. So beläuft sich die Anzahl an falsch-positiven Resistenzgennachweisen des GenoType insgesamt auf 13 (76,5 %).

3.2.1 Sensitivität und Spezifität des GenoType

Für den GenoType ergab sich eine Sensitivität von 67,2 % und eine Spezifität von 80,4 %.

3.2.2 Diskrepante Ergebnisse GenoType/Kultur

In den Tabellen 9 bis 15 sind die diskrepanten Ergebnisse von Kultur und GenoType noch einmal einzeln aufgeführt.

Tabelle 9: Zusätzliche Speziesdetektion durch den GenoType

Studien- nummer	Spezies	
	Kultur und GenoType	GenoType
6	<i>Streptococcus milleri</i> Gruppe/vergrünende Streptokokken	<i>Enterococcus faecalis</i>
24	<i>Streptococcus milleri</i> Gruppe/ <i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
26	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
51	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
60	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
78	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
111	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
122	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
128	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
130	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
110	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
117	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
123	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
120	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>

Tabelle 10: **Zusätzliche Speziesdetektion durch die Kultur**

	Spezies	
Studiennummer	Kultur und GenoType	Kultur
97	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
165	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>

Tabelle 11: **Kultur und GenoType positiv, aber gänzlich diskrepante Ergebnisse**

	Spezies	
Studiennummer	Kultur	GenoType
1	<i>Bacteroides</i> spp.	<i>Enterococcus faecalis</i>
43	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>
107	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
138	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter koseri</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i>
161	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>

Ergebnisse

Tabelle 12: Kultur positiv, GenoType negativ (14 Proben – 19 Speziesdetektionen)

Studien-nummer	Spezies Kultur
9	Gram-positive und Gram.negative Stäbchen (undifferenziert), <i>Bacteroides fragilis</i> *, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>
15	MRSA
19	Koagulase-negative Staphylokokken (undifferenziert)*
20	Koagulase-negative Staphylokokken (undifferenziert)*
30	<i>Escherichia coli</i>
62	<i>Staphylococcus aureus</i>
72	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
76	<i>Staphylococcus aureus</i>
84	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	<i>Propionibacterium acnes</i> *
135	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
151	<i>Proteus mirabilis</i>
179	<i>Propionibacterium acnes</i> *, <i>Staphylococcus epidermidis</i>
182	aerobe Sporenbildner (undifferenziert)*

*Erreger nicht im Spektrum des GenoType enthalten

Tabelle 13: Kultur negativ, GenoType positiv (27 Proben – 37 Speziesdetektionen)

Studiennummer	Spezies GenoType
3	<i>Streptococcus pneumoniae, Klebsiella oxytoca</i>
4	<i>Streptococcus pneumoniae, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca</i>
5	<i>Enterococcus faecalis</i>
13	<i>Proteus mirabilis</i>
18	<i>Escherichia coli</i>
32	<i>Staphylococcus aureus</i>
39	<i>Klebsiella oxytoca</i>
41	<i>Enterococcus faecium</i>
49	<i>Klebsiella oxytoca</i>
61	<i>Escherichia coli</i>
67	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae</i>
68	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
80	<i>Proteus mirabilis</i>
81	<i>Proteus mirabilis</i>
95	<i>Klebsiella oxytoca</i>
102	<i>Escherichia coli</i>
103	<i>Klebsiella oxytoca</i>
106	<i>Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium</i>
112	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae</i>
114	<i>Escherichia coli</i>
115	<i>Enterococcus faecium, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae</i>
119	<i>Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecium, Escherichia coli</i>
125	<i>Escherichia coli</i>
144	<i>Klebsiella oxytoca</i>
147	<i>Escherichia coli</i>
150	<i>Enterococcus faecium</i>
187	<i>Klebsiella oxytoca</i>

Ergebnisse

Zusammengefasst detektierte der GenoType 62 Spezies, die auf Kulturmedium nicht gewachsen waren, und die Kultur 27 Spezies, die der GenoType nicht detektierte. Die numerische Verteilung der einzelnen Spezies ist in den Tabellen 14 und 15 dargestellt. Darunter detektierte der GenoType am häufigsten *Enterococcus faecium* (14 Fälle) und *Escherichia coli* (13 Fälle), *Klebsiella oxytoca* (9 Fälle) und *Enterococcus faecalis* (8 Fälle); die Kultur *Staphylococcus aureus* (4 Fälle), *Enterobacter cloacae* und *Staphylococcus epidermidis* (jeweils 3 Fälle).

Tabelle 14: Numerische Verteilung der Spezies, die nur vom GenoType detektiert wurden

Spezies GenoType	Anzahl
<i>Enterococcus faecium</i>	14
<i>Escherichia coli</i>	13
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9
<i>Enterococcus faecalis</i>	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3
gesamt	62

Tabelle 15: Numerische Verteilung der Spezies, die nur von der Kultur detektiert wurden

Spezies	Anzahl
<i>Staphylococcus aureus</i> (davon MRSA)	4 (1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Bacteroides</i> spp.	2
Koagulase-negative Staphylokokken	2
<i>Propionibacterium acnes</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2
<i>Citrobacter koseri</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1
aerobe Sporenbildner (undifferenziert)	1
Gram-positive Stäbchen (undifferenziert)	1
Gram-negative Stäbchen (undifferenziert)	1
gesamt	27

Bezogen auf die Materialien der Proben, bei denen nur durch jeweils ein Testverfahren (Kultur oder GenoType) Speziesnachweise erbracht wurden, verhielt es sich folgendermaßen: Von den 14 in der Kultur und nicht beim GenoType positiv getesteten Proben waren acht Gewebeproben. Dahingegen detektierte der GenoType vornehmlich aus Punktaten von Liquor, Drainagesekreten oder anderen Körperflüssigkeiten Bakterienspezies, bei denen die Kultur negativ blieb, sowie zwei Mal aus Gewebeproben.

3.3 Vergleich broad-range PCR zu Kultur

Um eine Beurteilung der Sensitivität und Spezifität vom GenoType vornehmen zu können, zogen wir auch den Vergleich von 16S *broad-range* PCR zum Goldstandard

Ergebnisse

Kultur. Es zeigte sich, dass in 128 Proben (65,3 %) sowohl die *broad-range* PCR als auch die Kultur negativ waren. In 31 Proben (15,8 %) konnte die Kultur ein Wachstum vorweisen, wobei die *broad-range* PCR negativ blieb. Zehn Mal (5,1 %) verhielt es sich andersherum (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Vergleich der Ergebnisse von 16S PCR und Kultur

		Kultur		gesamt
		+	-	
<i>broad-range</i> PCR	+	19 (9,7 %)	10 (5,1 %)	29
	-	39 (19,9 %)	128 (65,3 %)	167
gesamt		58	138	196

Von 19 bei beiden positiven Proben (9,7 %) waren 14 (73,7 %) identisch, in vier Proben (21,1 %) fand die 16S *broad-range* PCR eine Spezies weniger und in einer Probe (5,3 %) zwei weniger. In fünf Proben (18,5 %) unterschieden sich die nachgewiesenen Spezies völlig voneinander und in drei Proben (11,1 %) ließ die Sequenzierung keine eindeutige Aussage über eine Spezies zu, sodass wir diese acht Proben als falsch-positiv werteten.

Zusätzlich konnten Kultur und 18S PCR in fünf Proben (2,6 %) beide dieselbe Pilzspezies nachweisen, davon sind drei Ergebnisse als für beide positiv mit in die Statistik eingegangen, da zusätzlich Bakterienkultur und 16S *broad-range* PCR kongruente Ergebnisse zeigten, zwei wurden unter diesem Punkt als negative Ergebnisse angesehen.

3.3.1 Sensitivität und Spezifität der *broad-range* PCR

Die Sensitivität und Spezifität der 16S *broad-range* PCR im Vergleich zur Kultur betrug 32,8 % bzw. 92,8 %.

4 Diskussion

4.1 Diskrepante Ergebnisse

In der vorliegenden Studie lag mit 46 gänzlich und 16 teilweise diskrepanten Ergebnissen bei 196 getesteten Proben eine relativ hohe Diskordanz zwischen Kultur und GenoType vor. Einundvierzig Ergebnisse waren dabei eindeutig diskrepant (+/- u. -/+) Aber auch von den 44 bei beiden positiven Ergebnissen zeigten fünf gänzlich unterschiedliche und 16 teilweise unterschiedliche Speziesnachweise, sodass sich eine Gesamtzahl von 62 diskrepanten Ergebnissen ergab.

In 62 Fällen detektierte der GenoType zusätzliche Spezies gegenüber der Kultur. Es handelte sich vor allem um *Enterococcus faecium* (14 Mal zusätzlich detektiert), *Escherichia coli* (13 Mal), *Klebsiella oxytoca* (9 Mal) und *Enterococcus faecalis* (8 Mal).

Eine Überlegenheit von genotypisch basierten Methoden zur Identifizierung dieser Spezies wurde schon in anderen Studien beobachtet. So konnten Domig et al. 2003 zeigen, dass die Charakterisierung und Differenzierung von *Enterococcus*-Spezies mittels PCR-basierten Verfahren gegenüber phänotypischen Methoden deutlich bessere Ergebnisse liefert [97]. Auch die Studienergebnisse von Palladino et al. aus dem gleichen Jahr zeigen, dass durch *real-time* PCR eine schnellere und sensitivere Detektion von Vancomycin-resistenten *Enterococcus*-Spezies möglich ist als durch kulturelle Verfahren [98].

Eine Unterlegenheit von kulturellen Methoden konnten vor über 25 Jahren Monnet et al. (1991) wie aktuell Stojowska-Swedrzynska et al. (2016) auch für den Nachweis von Klebsiellen zeigen. In ihren Studien stellten sie fest, dass die Kultivierung von Klebsiellen und ihre Klassifizierung anhand phänotypischer Methoden aufgrund der biochemischen Ähnlichkeit zu anderen Spezies oft schwierig ist [99, 100].

Für die Detektion von *Escherichia coli* gibt es in der Literatur vor allem Angaben über die Isolation aus Trinkwasser-, Nahrungsmittel- oder Stuhlproben. Diese bestätigen die Nachteile bezüglich vermehrten Zeitaufwands, geringerer Spezifität und geringerer Sensitivität von kulturellen Methoden. So beschreiben Mendes et al. in ihrem Review, dass kulturelle Verfahren keine Lösung für die Prävention von Krankheitsausbrüchen

durch *Escherichia coli*-kontaminiertes Wasser darstellten, da sie verzögerte und wenig spezifische und sensitive Ergebnisse lieferten; PCR-Verfahren seien hierbei in allen Belangen überlegen, auch wenn es weiterer Verfeinerungen bedürfe [101]. Brandao et al. machen in ihrem Review Ausführung darüber, dass auch bei Nahrungsmittelkontamination durch *Escherichia coli* sowie Staphylokokken- und Listerien-Spezies neuere *multiplex* PCR-Verfahren den konventionellen Verfahren überlegen seien [102]. Diese Ergebnisse können durch den Review von Abubakar et al. bestätigt werden, in der den PCR-Verfahren auch in Stuhlproben eine signifikant höhere Anzahl an Nachweisen von *Escherichia coli*-Spezies gelang, die trotz negativer Kultur als richtig-positiv angesehen wurden [103].

In unserer Studie zeigte sich der Trend der höheren Sensitivität bezüglich bestimmter Bakterienspezies von PCR-Verfahren gegenüber der Kultur allerdings nur für die *multiplex* PCR des GenoType-Verfahrens. Die *broad-range* PCR konnte mit insgesamt 37 positiven Ergebnissen und einer vergleichsweise sehr geringen Sensitivität von 32,8 % nur bedingt Interpretationshilfen zu den diskrepanten Ergebnissen beisteuern. So war die *broad-range* PCR zwar in der Mehrzahl der Fälle (34 von 47; 72,3 %) ebenso negativ wie Kultur oder GenoType, konnte aufgrund der geringen Sensitivität aber nicht als Bestätigung entweder des Kultur- oder des GenoType-Ergebnisses herangezogen werden. Dahingegen bestätigten die positiven Ergebnisse der *broad-range* PCR unter den diskrepanten Ergebnissen fünf Mal den GenoType und drei Mal die Kultur.

Als Schlussfolgerung kann daraus gezogen werden, dass der GenoType für die in seinem schmalen Spektrum enthaltenen Spezies eine wesentlich höhere Sensitivität aufweist als die *broad-range* PCR. Ursache dafür sind unter anderem die verwendeten Primer, die anders als die universellen Primer der *broad-range* PCR hochspezifisch an kurze Zielsequenzen einer Bakterienspezies binden. Diese kürzeren Zielsequenzen sind zudem besser vor präanalytischem DNA-Abbau geschützt und so auch in länger lagernden Proben noch nachweisbar. Zur Reduzierung dieses Bias wurden in der vorliegenden Studie nur Proben eingeschlossen, die vor weniger als 48 Stunden abgenommen worden waren. Einen weiteren Beitrag zur höheren Sensitivität der *targeted* PCR trägt das Multiplexverfahren bei, das pro Probe mehrere Spezies gleichzeitig detektieren kann. Die *broad-range* PCR kann nur eine Spezies pro Probe sicher identifizieren, sodass in der vorliegenden Studie zweimal nur unspezifische

Mischsequenzen nachgewiesen werden konnten und ein eindeutiger Speziesnachweis entfiel.

Die Überlegenheit der *broad-range* PCR im Bereich des großen Spektrums an nachweisbaren Spezies zeigte sich in der vorliegenden Studie in fünf Fällen, in denen die *broad-range* PCR Spezies nachweisen konnte, die der GenoType nicht in seinem Spektrum enthält.

Die Kultur zeigte unter ihren 26 zusätzlich detektierten Spezies keine solch eindeutige Überlegenheit bezüglich des Nachweises bestimmter Spezies. Darunter ist *Staphylococcus aureus* mit vier Fällen die häufigste von der Kultur, nicht aber vom GenoType nachgewiesene Spezies. Es folgen *Enterobacter cloacae* und *Staphylococcus epidermidis* mit jeweils drei Nachweisen und dahinter eine breite Verteilung anderer Spezies (s. Tabelle 18). In acht der 26 Fälle handelte es sich um Spezies, die nicht im Spektrum des GenoType enthalten sind (*Bacteroides* (2), *Propionibacterium acnes* (2), *Staphylococcus haemolyticus* (2), *Citrobacter koseri* (1) und *Haemophilus parainfluenzae* (1)).

4.2 Interpretation positiver Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, stellt die Interpretation positiver PCR-Ergebnisse eine große Herausforderung dar. Auch in unserer Studie haben wir festgestellt, dass der GenoType mit 108 Speziesnachweisen in 71 positiv getesteten Proben eine große Anzahl an Nachweisen lieferte, die wir weder durch den Vergleich zur Kultur noch durch das zusätzliche Heranziehen der als Vergleichsmethode dienenden *broad-range* PCR abschließend interpretieren konnten.

Dabei ist das bereits erwähnte und unter 4.7 diskutierte Risiko für falsch-positive Ergebnisse nur ein Aspekt, den es zu beachten gilt. Studien über die PCR-basierte Detektion von Bakterienspezies aus Blutproben nehmen dabei eine Rate von 2/3 an richtig-positiven und 1/3 an falsch-positiven Ergebnissen an, gemessen an der Korrelation mit klinischen und mikrobiologischen Daten [104].

Vornehmlich bleibt allerdings die Frage nach der klinischen Relevanz bzw. Pathogenität der nachgewiesenen Spezies. Eine Interpretation diesbezüglich könnte nur durch ein Studiendesign ermöglicht werden, das Informationen aus klinischer Präsentation,

bildgebenden Verfahren, Laboranalysen, Therapie und Therapieerfolg zusammenfügt [105]. Dieser interdisziplinäre Ansatz zwischen Klinikern und Mikrobiologen bezüglich der Pathogenität detektierter Bakterienspezies stellt auch den entscheidenden Angelpunkt der PCR-basierten Diagnostik im klinischen Alltag dar. Eine Beurteilung der vielen positiven Ergebnisse ist zurzeit aber auch in Zusammenschau mit klinischen Zeichen für eine Infektion oder Entzündung nicht immer möglich [106, 107].

Aktuelle mikrobiologische Forschungen zielen deshalb auf Verfahren für die Detektion von Pathogenitätsfaktoren ab [59]. Als Beispiele seien hier zwei Reviews aufgeführt. So identifizierten z.B. Gal-Mor et al. in ihrem Review Pathogenitätsinseln als geeignete Zielsequenzen für den Nachweis von Pathogenitätsfaktoren in Bakterienspezies. Als Pathogenitätsinseln werden Genbereiche auf Chromosomen von bakteriellen Erregern bezeichnet, die für verschiedene Virulenzfaktoren codieren und bei apathogenen Verwandten dieser Spezies nicht vorkommen [108]. Bei diesen Virulenzfaktoren handelt es sich z.B. um direkte Virulenzgene für Adhärenzfaktoren, Invasine oder Exotoxine, um funktionelle Mobilitätsgene, wie Integrase, oder um tRNA-Gene, die für die Plasmidübertragung erforderlich sind [108]. Bonar et al. verfassten einen großen Review über die Detektion von Pathogenitätsfaktoren auf der Ebene des Proteoms anstatt des Genoms [109]. So evaluierten sie zwei unterschiedliche Ansätze der Proteomik, bei denen der Nachweis bestimmter Proteine Aussagen über die Virulenz von *Staphylococcus*-Spezies zuließe. Sie beleuchteten dabei den Vorteil, dass sich das Proteom dynamisch verhält und damit eine Interpretation der aktuellen Pathogenität der detektierten Spezies erlaube [109].

Mikrobiologische Verfahren, die diese spezifischen Pathogenitätsfaktoren nachweisen, stellen mutmaßlich die Zukunft der Diagnostik bakterieller Infektionen dar.

4.3 Sensitivität und Spezifität des GenoType

Mit 150 kongruenten Ergebnissen zum Goldstandard Kultur, davon 39 positiven und 111 negativen, weist der GenoType eine Sensitivität von 67,2 % und eine Spezifität von 80,4 % auf.

In aktuellen Studien konnten für andere *multiplex* PCR-Verfahren je nach Bakterienspezies vergleichbare, aber auch bessere und schlechtere Ergebnisse erzielt

werden: Wang et al. evaluierten insgesamt fünf *multiplex* PCR-Verfahren für den Nachweis von *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* bei Patienten mit Verdacht auf bakterielle Meningitis und konnten eine Sensitivität zwischen 73,6 % und 96 % und eine Spezifität zwischen 33,3 % und 99 % feststellen [110]. In der Studie von Leli et al. konnte für die SeptiFast *multiplex* PCR bei Patienten mit infektiöser Endokarditis eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 100 % erreicht werden [111]. Für gastrointestinale Pathogene zeigte sich in der Studie von Reddington et al. eine Sensitivität zwischen 90 und 100 % sowie eine Spezifität zwischen 91 und 99 % für das *multiplex* PCR-Verfahren Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel [112]. Auf jeweils 95 % Sensitivität und Spezifität kam laut einer großen Übersichtsarbeit von Chang et al. die *multiplex* PCR LightCycler SeptiFast für den Nachweis von 25 Bakterienspezies aus Blutproben [113].

An die weit verbreiteten Sensitivitäten und Spezifitäten von über 90 % konnte der GenoType in unserer Studie nicht anknüpfen.

Verglichen mit der studieninternen *broad-range* PCR zeigte sich die Unterlegenheit des GenoType mit 80,4 % gegenüber 92,8 % nur bei der Spezifität.

In Bezug auf die Sensitivität von 67,2 % des GenoType gegenüber 32,8 % der *broad-range* PCR lässt sich aber eine wesentlich höhere Aussagekraft bezüglich der positiven Ergebnisse durch die *multiplex* PCR des GenoType vermuten (s. Kapitel 4.1).

4.4 Kultur – guter Goldstandard?

Wir konnten in der vorliegenden Studie feststellen, dass der GenoType insgesamt 62 Bakterienspezies mehr detektierte als die Kultur. Es ist anzunehmen, dass nicht alle zusätzlichen Speziesnachweise auf falsch-positive Ergebnisse zurückzuführen sind. Wie unter 4.2 geschrieben, nehmen andere Studien eine Rate von 2/3 an richtig-positiven und 1/3 an falsch-positiven Ergebnissen an.

Eine abschließende Beurteilung über die Richtigkeit und die klinische Bedeutsamkeit dieser Nachweise können wir anhand unseres Studiendesigns nicht treffen. Dennoch konnten auch andere Studien hinsichtlich des Bakteriennachweises immer wieder eine Überlegenheit von PCR-Verfahren gegenüber dem aktuellen Goldstandard Kultur feststellen [114-116]. Sachse et al. schließen aus ihren Studienergebnissen sogar, dass

ein Vergleich unmöglich erscheint, da konventionelle Methoden den PCR-Verfahren in Sensitivität und Spezifität unterlegen seien [59].

Eine Überlegenheit der *broad-range* PCR gegenüber der Kultur konnten wir in unserer Studie allerdings nicht feststellen. Gründe für die geringere Sensitivität einer Breitspektrum-PCR gegenüber einer *multiplex* PCR mit deutlich schmalere Spektrum an nachweisbaren Bakterienspezies sind in Kapitel 4.1 dargestellt.

4.5 Resistenzbestimmung

Mit sechs nicht plausiblen von insgesamt 17 Resistenznachweisen weist der GenoType in unserer Studie eine hohe Rate (35,3 %) an intrinsischem Fehlerpotential auf. Als einzig plausible Ursache für dieses Ergebnis erscheint uns die Kontaminationsanfälligkeit des GenoType-Verfahrens, die in Kapitel 4.7 diskutiert wird.

Von den elf plausiblen Resistenznachweisen konnten lediglich acht tatsächlich ausgewertet werden (s. Kapitel 3.2), sodass eine abschließende Evaluation des Resistenznachweises mithilfe des GenoType-Verfahrens durch die vorliegende Studie nicht erfolgen kann. Hierzu bedürfte es eines anderen Studiendesigns, z.B. mit ausschließlicher Einbeziehung von Staphylokokken- und Enterokokkennachweisen.

4.6 Erregerspektrum

Der GenoType umfasst ein Spektrum von 16 Bakterienspezies, davon sechs Gram-positive und acht Gram-negative (s. Kapitel 2.4.1.2.3). Ursprünglich wurde der GenoType konzipiert für den Bakteriennachweis aus positiven Blutkulturen, um die Spezifität der konventionellen Sepsis-Diagnostik zu verbessern. Wir konnten in der vorliegenden Studie jedoch zeigen, dass der GenoType eine nützliche zusätzliche Untersuchung zum Goldstandard Kultur im Hinblick auf die in der Einleitung genannten Krankheitsbilder darstellen könnte. Zwar detektierten Kultur und *broad-range* PCR jeweils in zehn Fällen Spezies, die nicht im Spektrum des GenoTypes enthalten sind, aber es wird ersichtlich, dass das Spektrum des GenoType oftmals die häufigsten bakteriellen Erreger der oben genannten Krankheiten abdeckt.

So ist der GenoType nahezu uneingeschränkt geeignet für das Erregerspektrum der septischen Arthritis (ca. 90 %ige Abdeckung), der spontanen bakteriellen Peritonitis (ca. 98 %) und der akuten Pankreatitis (nahezu 100 %).

Etwas schlechter geeignet zeigt sich der GenoType mit ca. 60 %iger Abdeckung für den Nachweis der häufigsten Erreger der ambulant und auch der nosokomial erworbenen Pleuritis sowie der akuten postoperativen Mediastinitis und der infektiösen Endokarditis.

Bei einem Krankheitsbild beinhaltet der GenoType die wenigsten relevanten Erreger: So kann der GenoType mit *Streptococcus pneumoniae* nur einen der fünf häufigsten Erreger der bakteriellen Meningitis detektieren.

Ein absolutes Defizit des GenoType gegenüber der Kultur und der *broad-range* PCR besteht dahingehend, dass das Spektrum keine Pilzspezies beinhaltet. Dies zeigte sich für die oben beschriebenen Krankheiten aber als eher irrelevant.

4.7 Kontaminationsanfälligkeit

Ein in dieser Studie aufgetauchtes Problem des GenoType-Verfahrens ist die auch für andere PCR-Verfahren beschriebene Kontaminationsanfälligkeit.

Zur Risikominimierung wurden die Arbeitsschritte des GenoType-Protokolls strikt getrennt: die DNA-Aufreinigung, das Ansetzen des Master-Mix, die Zugabe der isolierten DNA zum aliquotierten Master-Mix und die anschließende Hybridisierung wurden in vier unterschiedlichen Räumen durchgeführt. Trotzdem mussten einige Proben erneut getestet werden, da vor allem der Hybridisierungsschritt eine erhöhte Kontaminationsgefahr barg. Dabei wurden die amplifizierten DNA-Proben jeweils in zwölf Kavitäten einer einzelnen Wanne gegeben; Hybridisierungspuffer und andere Reagenzien wurden nach Arbeitsanweisung zunächst mithilfe einer Vakuumpumpe abpipettiert, in weiteren Schritten aber auch ausgekippt und auf saugfähigem Papier abgetupft. Hier mussten einige Proben erneut der Hybridisierung unterzogen werden, da eine *carry-over* Kontamination nicht immer ausgeschlossen werden konnte.

Eine deutliche Senkung der Kontaminationsanfälligkeit konnte in Studien für automatisierte Aufreinigungs- und PCR-Systeme gezeigt werden [117]. Aber auch hier ist die Gefahr für falsch-positive Ergebnisse weiterhin gegeben [118], vor allem wegen

der hohen Sensitivität von PCR-basierten Verfahren verbunden mit der exponentiellen Amplifikation von auch minimalen DNA-Rückständen [118, 119]. Durch die in der vorliegenden Studie verwendete Drei-Raum-Lösung konnte letztere Kontaminationsanfälligkeit nahezu ausgeschlossen werden.

4.8 Praktikabilität

Die einzelnen Arbeitsschritte des GenoType-Verfahrens sind klar beschrieben und durch eine eingearbeitete Kraft einfach durchzuführen. Allerdings ist vor allem die DNA-Aufreinigung mittels GenoType BacExtract ein sehr aufwendiges und zeitintensives Verfahren.

Mögliche Fehlerquellen tun sich auch bei der Hybridisierung und Detektion mittels GenoType Bac-IDent auf. Bei der Hybridisierung konnte eine Kontamination benachbarter Kavitäten durch Amplifikate angrenzender Kavitäten nicht immer verhindert werden (s. Kapitel 4.9), sodass einige Hybridisierungen wiederholt durchgeführt werden mussten.

Bei der Detektion zeigten sich mitunter Schwierigkeiten bei der Auswertung der Membranstreifen. Laut Protokoll konnte eine Bande dann als positiv gewertet, wenn ihre Intensität etwa gleich stark oder stärker war als die der Amplifikationskontrolle. Dies barg zwei Probleme: erstens handelt es sich hierbei um eine relative Referenz, weshalb die Einschätzung zwangsläufig subjektiv war, darüber hinaus war die Bande der Amplifikationskontrolle stellenweise für gesamte PCR-Läufe sehr schwach ausgeprägt, sodass eine Interpretation der Streifen erschwert wurde.

4.9 Zeitaufwand

Die Zeit von Probeneingang bis zum endgültigen Ergebnis beträgt bei manueller Durchführung der einzelnen GenoType-Schritte laut Protokoll ca. sechs Stunden. In unserer Studie konnten wir feststellen, dass auch bei reibungslosem und routiniertem Ablauf mindestens sieben bis acht Stunden bis zum endgültigen Ergebnis verstreichen. Damit ist der GenoType dem Goldstandard Kultur deutlich überlegen, bei dem es mindestens 24 bis zu 72 Stunden dauert, bis ein endgültiges Ergebnis vorliegt. Die

16S/18S *broad-range* PCR zeigt zwar unmittelbar positive Proben an und auch die vorherige DNA-Aufreinigung spart durch das automatisierte EZ1-Programm Zeit gegenüber der manuellen DNA-Aufreinigung mit GenoType BacExtract, die anschließende Sequenzierung dauert aber auch in der Routinediagnostik mehrere Stunden bis zu einen Tag, je nach Probenverarbeitung im BMFZ.

Mit sechs bis acht Stunden von Probeneingang bis zur Identifikation einer Spezies liegt der GenoType innerhalb der Zeitspanne von einigen Stunden, die in vielen Studien für vergleichbare molekulargenetische Tests angegeben wird [120]. In einem großen Review von Bauer et al. werden für die 24 dort aufgeführten Tests teils deutlich kürzere Zeitspannen zwischen 0,3 Stunden und sechs Stunden angegeben [121]. Trotzdem befindet sich die Detektionszeit des GenoType im Gegensatz zu der des Goldstandards innerhalb des Zeitraumes von sechs bis 24 Stunden, der bei schwerwiegend erkrankten Patienten als kritische Phase für die Einleitung einer gezielten antimikrobiellen Therapie angesehen wird [120]. Die schnelle Detektion mittels GenoType könnte damit auch einen wesentlichen Beitrag zur Reduktion von Krankenhausaufenthaltsdauer, Mortalität, unnötiger Isolation, Resistenzbildung und Kosten für das Gesundheitssystem leisten [121].

4.10 Schlussfolgerungen

Das GenoType-Verfahren wurde ursprünglich für den Bakteriennachweis aus Blutkulturen konzipiert. Die vorliegenden Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass der bakterielle Erregernachweis aus anderen, zuvor nicht kulturell angezüchteten Körpermaterialien nicht so zuverlässig gelingt. Zwar konnten eine Vielzahl an Bakteriennachweisen durch den GenoType verzeichnet werden, 40 % davon wurden jedoch als falsch-positiv gewertet, was im Ergebnis zu einer geringen Sensitivität von 67,2 % führte. In der Diskussion konnte dargelegt werden, dass vor allem die Kontaminationsanfälligkeit des GenoType-Verfahrens potentiell einen Großteil dieser falsch-positiven Ergebnisse verursacht hat. Dennoch ist anzunehmen, dass in der vorliegenden Studie - wie im Review von Klouche et al. beschrieben (vgl. Kapitel 4.2) - einige dieser zur Kultur diskrepanten Bakteriennachweise auch als Überlegenheit eines PCR-basierten Verfahrens betrachtet werden könnten: der Bakteriennachweis gelingt unabhängig von präanalytischer Antibiotikatherapie und ungeachtet der Vitalität der Bakterien. Setzt man also etwa ein Drittel richtig-positiver Bakteriennachweise voraus,

Diskussion

beliefe sich die Sensitivität dennoch nur auf ca. 72 %. Auch die Spezifität reicht mit 80,4 % nicht an die Werte von PCR-basierten Verfahren in anderen Studien heran.

Eine verlässliche Evaluation des Resistenznachweises des GenoType-Verfahrens konnten wir aufgrund der geringen Anzahl an Resistenzgennachweisen nicht vornehmen. Mit sechs von 17 nicht plausiblen Ergebnissen deutet sich allerdings in der vorliegenden Studie ein hohes intrinsisches Fehlerpotential dieses Teils der GenoType *multiplex* PCR an, deren abschließende Beurteilung anderer Studiendesigns bedürfte.

So scheinen die gut evaluierten Bereiche des GenoType-Verfahrens in den Hintergrund zu rücken. Denn nur mit einer deutlich besseren Aussagekraft des Endergebnisses könnten die kurze Durchführungszeit von sieben bis acht Stunden und das meist gut auf die entscheidenden Krankheitserreger abgestimmte Spektrum des Verfahrens einen Beitrag zur schnelleren Therapieeinleitung und damit zum besseren *outcome* der Patienten leisten.

5 Literaturverzeichnis

1. Organization WH: **WHO Health Statistics 2015**. In.: *World Health Organization*; 2015: 1-164.
2. Funk DJ, Kumar A: **Antimicrobial therapy for life-threatening infections: speed is life**. *Crit Care Clin* 2011, **27**(1):53-76.
3. van de Beek D, Brouwer M, Hasbun R, Koedel U, Whitney CG, Wijdicks E: **Community-acquired bacterial meningitis**. *Nat Rev Dis Primers* 2016, **2**:16074.
4. Okike IO, Ribeiro S, Ramsay ME, Heath PT, Sharland M, Ladhani SN: **Trends in bacterial, mycobacterial, and fungal meningitis in England and Wales 2004-11: an observational study**. *Lancet Infect Dis* 2014, **14**(4):301-307.
5. Pollard AJ: **Global epidemiology of meningococcal disease and vaccine efficacy**. *Pediatr Infect Dis J* 2004, **23**(12 Suppl):S274-279.
6. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY *et al*: **Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010**. *Lancet* 2012, **380**(9859):2095-2128.
7. Fuller DG, Duke T, Shann F, Curtis N: **Antibiotic treatment for bacterial meningitis in children in developing countries**. *Ann Trop Paediatr* 2003, **23**(4):233-253.
8. Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, Harrison LH, Farley MM, Reingold A, Bennett NM *et al*: **Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007**. *N Engl J Med* 2011, **364**(21):2016-2025.
9. Tzanakaki G, Mastrantonio P: **Aetiology of bacterial meningitis and resistance to antibiotics of causative pathogens in Europe and in the Mediterranean region**. *Int J Antimicrob Agents* 2007, **29**(6):621-629.
10. Bottomley MJ, Serruto D, Safadi MA, Klugman KP: **Future challenges in the elimination of bacterial meningitis**. *Vaccine* 2012, **30** Suppl 2:B78-86.
11. Maskell NA, Batt S, Hedley EL, Davies CW, Gillespie SH, Davies RJ: **The bacteriology of pleural infection by genetic and standard methods and its mortality significance**. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **174**(7):817-823.
12. Strange C, Sahn SA: **The definitions and epidemiology of pleural space infection**. *Semin Respir Infect* 1999, **14**(1):3-8.
13. Davies HE, Davies RJ, Davies CW, Group BTSPDG: **Management of pleural infection in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010**. *Thorax* 2010, **65** Suppl 2:ii41-53.
14. Kiefer TL, Bashore TM: **Infective endocarditis: a comprehensive overview**. *Rev Cardiovasc Med* 2012, **13**(2-3):e105-120.
15. Hoen B, Duval X: **Clinical practice. Infective endocarditis**. *N Engl J Med* 2013, **368**(15):1425-1433.
16. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miro JM, Fowler VG, Jr., Bayer AS, Karchmer AW, Olaison L, Pappas PA, Moreillon P *et al*: **Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study**. *Arch Intern Med* 2009, **169**(5):463-473.
17. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, 3rd, Guyton RA, O'Gara PT, Ruiz CE, Skubas NJ, Sorajja P *et al*: **2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the**

- American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014, **148**(1):e1-e132.**
18. Vogkou CT, Vlachogiannis NI, Palaiodimos L, Kousoulis AA: **The causative agents in infective endocarditis: a systematic review comprising 33,214 cases.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016, **35**(8):1227-1245.
 19. Jablonski S, Brocki M, Kordiak J, Misiak P, Terlecki A, Kozakiewicz M: **Acute mediastinitis: evaluation of clinical risk factors for death in surgically treated patients.** *ANZ J Surg* 2013, **83**(9):657-663.
 20. El Oakley RM, Wright JE: **Postoperative mediastinitis: classification and management.** *Ann Thorac Surg* 1996, **61**(3):1030-1036.
 21. Dubost C, Kaswin D, Duranteau A, Jehanno C, Kaswin R: **Esophageal perforation during attempted endotracheal intubation.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979, **78**(1):44-51.
 22. Athanassiadi KA: **Infections of the mediastinum.** *Thorac Surg Clin* 2009, **19**(1):37-45, vi.
 23. Jablonski S, Brocki M, Krzysztof K, Wawrzycki M, Santorek-Strumillo E, Lobos M, Kozakiewicz M: **Evaluation of prognostic value of selected biochemical markers in surgically treated patients with acute mediastinitis.** *Med Sci Monit* 2012, **18**(5):CR308-315.
 24. Kruger M, Decker S, Schneider JP, Haverich A, Schega O: **[Surgical treatment of acute mediastinitis].** *Chirurg* 2016, **87**(6):478-485.
 25. Ambrosch A: **[Rational antibiotic treatment of mediastinitis].** *Chirurg* 2016, **87**(6):497-503.
 26. Charbonneau H, Maillet JM, Faron M, Mangin O, Puymirat E, Le Besnerais P, Du Puy-Montbrun L, Achouh P, Diehl JL, Fagon JY *et al*: **Mediastinitis due to Gram-negative bacteria is associated with increased mortality.** *Clin Microbiol Infect* 2014, **20**(3):O197-202.
 27. Lippi G, Danese E, Cervellin G, Montagnana M: **Laboratory diagnostics of spontaneous bacterial peritonitis.** *Clin Chim Acta* 2014, **430**:164-170.
 28. Caruntu FA, Benea L: **Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, treatment.** *J Gastrointest Liver Dis* 2006, **15**(1):51-56.
 29. Koulaouzidis A, Bhat S, Karagiannidis A, Tan WC, Linaker BD: **Spontaneous bacterial peritonitis.** *Postgrad Med J* 2007, **83**(980):379-383.
 30. Nobre SR, Cabral JE, Gomes JJ, Leitao MC: **In-hospital mortality in spontaneous bacterial peritonitis: a new predictive model.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008, **20**(12):1176-1181.
 31. Dever JB, Sheikh MY: **Review article: spontaneous bacterial peritonitis--bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention.** *Aliment Pharmacol Ther* 2015, **41**(11):1116-1131.
 32. Horowitz DL, Katzap E, Horowitz S, Barilla-LaBarca ML: **Approach to septic arthritis.** *Am Fam Physician* 2011, **84**(6):653-660.
 33. Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, Coakley G: **Bacterial septic arthritis in adults.** *Lancet* 2010, **375**(9717):846-855.
 34. Kaandorp CJ, Krijnen P, Moens HJ, Habbema JD, van Schaardenburg D: **The outcome of bacterial arthritis: a prospective community-based study.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(5):884-892.
 35. Gupta MN, Sturrock RD, Field M: **A prospective 2-year study of 75 patients with adult-onset septic arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2001, **40**(1):24-30.
 36. Ryan MJ, Kavanagh R, Wall PG, Hazleman BL: **Bacterial joint infections in England and Wales: analysis of bacterial isolates over a four year period.** *Br J Rheumatol* 1997, **36**(3):370-373.

37. Slavin J, Ghaneh P, Sutton R, Hartley M, Rowlands P, Garvey C, Hughes M, Neoptolemos J: **Management of necrotizing pancreatitis.** *World J Gastroenterol* 2001, **7**(4):476-481.
38. Spanier B, Bruno MJ, Dijkgraaf MG: **Incidence and mortality of acute and chronic pancreatitis in the Netherlands: a nationwide record-linked cohort study for the years 1995-2005.** *World J Gastroenterol* 2013, **19**(20):3018-3026.
39. Vidarsdottir H, Moller PH, Vidarsdottir H, Thorarinsdottir H, Bjornsson ES: **Acute pancreatitis: a prospective study on incidence, etiology, and outcome.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013, **25**(9):1068-1075.
40. Roberts SE, Akbari A, Thorne K, Atkinson M, Evans PA: **The incidence of acute pancreatitis: impact of social deprivation, alcohol consumption, seasonal and demographic factors.** *Aliment Pharmacol Ther* 2013, **38**(5):539-548.
41. Wall I, Badalov N, Baradaran R, Iswara K, Li JJ, Tenner S: **Decreased mortality in acute pancreatitis related to early aggressive hydration.** *Pancreas* 2011, **40**(4):547-550.
42. Gloor B, Muller CA, Worni M, Stahel PF, Redaelli C, Uhl W, Buchler MW: **Pancreatic infection in severe pancreatitis: the role of fungus and multiresistant organisms.** *Arch Surg* 2001, **136**(5):592-596.
43. Beger HG, Bittner R, Block S, Buchler M: **Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study.** *Gastroenterology* 1986, **91**(2):433-438.
44. Gerzof SG, Banks PA, Robbins AH, Johnson WC, Spechler SJ, Wetzner SM, Snider JM, Langevin RE, Jay ME: **Early diagnosis of pancreatic infection by computed tomography-guided aspiration.** *Gastroenterology* 1987, **93**(6):1315-1320.
45. Bassi C, Larvin M, Villatoro E: **Antibiotic therapy for prophylaxis against infection of pancreatic necrosis in acute pancreatitis.** *Cochrane Database Syst Rev* 2003(4):CD002941.
46. Howard TJ, Temple MB: **Prophylactic antibiotics alter the bacteriology of infected necrosis in severe acute pancreatitis.** *J Am Coll Surg* 2002, **195**(6):759-767.
47. Noor MT, Radhakrishna Y, Kochhar R, Ray P, Wig JD, Sinha SK, Singh K: **Bacteriology of infection in severe acute pancreatitis.** *JOP* 2011, **12**(1):19-25.
48. Tsui NC, Zhao E, Li Z, Miao B, Cui Y, Shen Y, Qu P: **Microbiological findings in secondary infection of severe acute pancreatitis: a retrospective clinical study.** *Pancreas* 2009, **38**(5):499-502.
49. Garg PK, Khanna S, Bohidar NP, Kapil A, Tandon RK: **Incidence, spectrum and antibiotic sensitivity pattern of bacterial infections among patients with acute pancreatitis.** *J Gastroenterol Hepatol* 2001, **16**(9):1055-1059.
50. Weile J, Knabbe C: **Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology.** *Anal Bioanal Chem* 2009, **394**(3):731-742.
51. Budding AE, Hoogewerf M, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH: **Automated Broad-Range Molecular Detection of Bacteria in Clinical Samples.** *J Clin Microbiol* 2016, **54**(4):934-943.
52. Houpikian P, Raoult D: **Traditional and molecular techniques for the study of emerging bacterial diseases: one laboratory's perspective.** *Emerg Infect Dis* 2002, **8**(2):122-131.
53. Clarridge JE, 3rd: **Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases.** *Clin Microbiol Rev* 2004, **17**(4):840-862, table of contents.

54. Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, Hanson KE, May L, Quinn TC, Tenover FC, Alland D, Blaschke AJ, Bonomo RA *et al*: **Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases.** *Clin Infect Dis* 2013, **57 Suppl 3**:S139-170.
55. Fredricks DN, Relman DA: **Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases.** *Clin Infect Dis* 1999, **29**(3):475-486; quiz 487-478.
56. Nissen MD, Sloots TP: **Rapid diagnosis in pediatric infectious diseases: the past, the present and the future.** *Pediatr Infect Dis J* 2002, **21**(6):605-612; discussion 613-604.
57. Livermore DM, Wain J: **Revolutionising bacteriology to improve treatment outcomes and antibiotic stewardship.** *Infect Chemother* 2013, **45**(1):1-10.
58. Millar BC, Xu J, Moore JE: **Molecular diagnostics of medically important bacterial infections.** *Curr Issues Mol Biol* 2007, **9**(1):21-39.
59. Sachse K: **Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens.** *Mol Biotechnol* 2004, **26**(1):61-80.
60. Toouli CD, Turner DR, Grist SA, Morley AA: **The effect of cycle number and target size on polymerase chain reaction amplification of polymorphic repetitive sequences.** *Anal Biochem* 2000, **280**(2):324-326.
61. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M: **Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach.** *J Clin Lab Anal* 2002, **16**(1):47-51.
62. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS: **General concepts for PCR primer design.** *PCR Methods Appl* 1993, **3**(3):S30-37.
63. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W: **Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications.** *Nucleic Acids Res* 1992, **20**(7):1717-1723.
64. Piatak M, Jr., Luk KC, Williams B, Lifson JD: **Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species.** *Biotechniques* 1993, **14**(1):70-81.
65. Becker-Andre M, Hahlbrock K: **Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATY).** *Nucleic Acids Res* 1989, **17**(22):9437-9446.
66. Barken KB, Haagensen JA, Tolker-Nielsen T: **Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections.** *Clin Chim Acta* 2007, **384**(1-2):1-11.
67. Kusunoki S, Ezaki T: **Proposal of Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev., and elevation of Mycobacterium chelonae subsp. abscessus (Kubica et al.) to species status: Mycobacterium abscessus comb. nov.** *Int J Syst Bacteriol* 1992, **42**(2):240-245.
68. Ota N, Hirano K, Warashina M, Andrus A, Mullah B, Hatanaka K, Taira K: **Determination of interactions between structured nucleic acids by fluorescence resonance energy transfer (FRET): selection of target sites for functional nucleic acids.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**(3):735-743.
69. Tyagi S, Kramer FR: **Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization.** *Nat Biotechnol* 1996, **14**(3):303-308.
70. Yang S, Rothman RE: **PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings.** *Lancet Infect Dis* 2004, **4**(6):337-348.
71. Mothershed EA, Whitney AM: **Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory.** *Clin Chim Acta* 2006, **363**(1-2):206-220.

72. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL: **Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions.** *Gene* 1990, **93**(1):125-128.
73. Carroll NM, Adamson P, Okhravi N: **Elimination of bacterial DNA from Taq DNA polymerases by restriction endonuclease digestion.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**(10):3402-3404.
74. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF: **Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.** *Int J Food Microbiol* 1992, **17**(1):37-45.
75. Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Lovenklev M, Lofstrom C: **Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples.** *Mol Biotechnol* 2004, **26**(2):133-146.
76. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R: **PCR inhibitors - occurrence, properties and removal.** *J Appl Microbiol* 2012, **113**(5):1014-1026.
77. Al-Soud WA, Jonsson LJ, Radstrom P: **Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(1):345-350.
78. Al-Soud WA, Radstrom P: **Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(2):485-493.
79. Demeke T, Jenkins GR: **Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits.** *Anal Bioanal Chem* 2010, **396**(6):1977-1990.
80. Opel KL, Chung D, McCord BR: **A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR.** *J Forensic Sci* 2010, **55**(1):25-33.
81. Wolk D, Mitchell S, Patel R: **Principles of molecular microbiology testing methods.** *Infect Dis Clin North Am* 2001, **15**(4):1157-1204.
82. Popoff MR: **Detection of toxigenic clostridia.** *Methods Mol Biol* 2003, **216**:137-152.
83. Fach P, Guillou JP: **Detection by in vitro amplification of the alpha-toxin (phospholipase C) gene from Clostridium perfringens.** *J Appl Bacteriol* 1993, **74**(1):61-66.
84. Fenollar F, Raoult D: **Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms.** *APMIS* 2004, **112**(11-12):785-807.
85. Martinez JL: **General principles of antibiotic resistance in bacteria.** *Drug Discov Today Technol* 2014, **11**:33-39.
86. Levy SB, Marshall B: **Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.** *Nat Med* 2004, **10**(12 Suppl):S122-129.
87. Metan G, Zarakolu P, Unal S: **Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci.** *J Hosp Infect* 2005, **61**(2):93-99.
88. Bal AM, Gould IM: **Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus and its relevance in therapy.** *Expert Opin Pharmacother* 2005, **6**(13):2257-2269.
89. Fuda CC, Fisher JF, Mobashery S: **Beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus: the adaptive resistance of a plastic genome.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(22):2617-2633.
90. Sergelidis D, Angelidis AS: **Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): A controversial food-borne pathogen.** *Lett Appl Microbiol* 2017.
91. Palavecino EL: **Clinical, epidemiologic, and laboratory aspects of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections.** *Methods Mol Biol* 2014, **1085**:1-24.
92. Tenover FC, Jones RN, Swenson JM, Zimmer B, McAllister S, Jorgensen JH: **Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-**

- negative staphylococci: results of a multicenter study.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**(12):4051-4058.
93. Reynolds PE: **Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989, **8**(11):943-950.
94. Chunhui C, Xiaogang X: **Genetic characteristics of vancomycin resistance gene cluster in Enterococcus spp.** *Yi Chuan* 2015, **37**(5):452-457.
95. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH *et al*: **Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe.** *Euro Surveill* 2008, **13**(47).
96. Zirakzadeh A, Patel R: **Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment.** *Mayo Clin Proc* 2006, **81**(4):529-536.
97. Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W: **Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp. 2. Pheno- and genotypic criteria.** *Int J Food Microbiol* 2003, **88**(2-3):165-188.
98. Palladino S, Kay ID, Flexman JP, Boehm I, Costa AM, Lambert EJ, Christiansen KJ: **Rapid detection of vanA and vanB genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(6):2483-2486.
99. Monnet D, Freney J, Brun Y, Boeufgras JM, Fleurette J: **Difficulties in identifying Klebsiella strains of clinical origin.** *Zentralbl Bakteriol* 1991, **274**(4):456-464.
100. Stojowska-Swedrzynska K, Krawczyk B: **A new assay for the simultaneous identification and differentiation of Klebsiella oxytoca strains.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2016, **100**(23):10115-10123.
101. Mendes Silva D, Domingues L: **On the track for an efficient detection of Escherichia coli in water: A review on PCR-based methods.** *Ecotoxicol Environ Saf* 2015, **113**:400-411.
102. Brandao D, Liebana S, Pividori MI: **Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles.** *N Biotechnol* 2015, **32**(5):511-520.
103. Abubakar I, Irvine L, Aldus CF, Wyatt GM, Fordham R, Schelenz S, Shepstone L, Howe A, Peck M, Hunter PR: **A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food.** *Health Technol Assess* 2007, **11**(36):1-216.
104. Klouche M, Schroder U: **Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections.** *Clin Chem Lab Med* 2008, **46**(7):888-908.
105. Rampini SK, Bloemberg GV, Keller PM, Buchler AC, Dollenmaier G, Speck RF, Bottger EC: **Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections.** *Clin Infect Dis* 2011, **53**(12):1245-1251.
106. Fenollar F, Levy PY, Raoult D: **Usefulness of broad-range PCR for the diagnosis of osteoarticular infections.** *Curr Opin Rheumatol* 2008, **20**(4):463-470.
107. Jatou K, Greub G: **[PCR in microbiology: from DNA amplification to results interpretation].** *Rev Med Suisse* 2007, **3**(106):931-932, 934-938.
108. Gal-Mor O, Finlay BB: **Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence.** *Cell Microbiol* 2006, **8**(11):1707-1719.
109. Bonar E, Wojcik I, Wladyka B: **Proteomics in studies of Staphylococcus aureus virulence.** *Acta Biochim Pol* 2015, **62**(3):367-381.

110. Wang X, Theodore MJ, Mair R, Trujillo-Lopez E, du Plessis M, Wolter N, Baughman AL, Hatcher C, Vuong J, Lott L *et al*: **Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**(3):702-708.
111. Leli C, Moretti A, Pasticci MB, Cenci E, Bistoni F, Mencacci A: **A commercially available multiplex real-time PCR for detection of pathogens in cardiac valves from patients with infective endocarditis.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014, **79**(1):98-101.
112. Reddington K, Tuite N, Minogue E, Barry T: **A current overview of commercially available nucleic acid diagnostics approaches to detect and identify human gastroenteritis pathogens.** *Biomol Detect Quantif* 2014, **1**(1):3-7.
113. Chang SS, Hsieh WH, Liu TS, Lee SH, Wang CH, Chou HC, Yeo YH, Tseng CP, Lee CC: **Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis - a systemic review and meta-analysis.** *PLoS One* 2013, **8**(5):e62323.
114. Levy PY, Fournier PE, Fenollar F, Raoult D: **Systematic PCR detection in culture-negative osteoarticular infections.** *Am J Med* 2013, **126**(12):1143 e1125-1133.
115. Wang Y, Guo G, Wang H, Yang X, Shao F, Yang C, Gao W, Shao Z, Zhang J, Luo J *et al*: **Comparative study of bacteriological culture and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) and multiplex PCR-based reverse line blot (mPCR/RLB) hybridization assay in the diagnosis of bacterial neonatal meningitis.** *BMC Pediatr* 2014, **14**:224.
116. Keane OM, Budd KE, Flynn J, McCoy F: **Increased detection of mastitis pathogens by real-time PCR compared to bacterial culture.** *Vet Rec* 2013, **173**(11):268.
117. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, 3rd *et al*: **Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing.** *Clin Microbiol Rev* 2006, **19**(1):165-256.
118. Aslanzadeh J: **Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory.** *Ann Clin Lab Sci* 2004, **34**(4):389-396.
119. Sarkar G, Sommer S: **More light on PCR contamination.** *Nature* 1990, **347**(6291):340-341.
120. Gray J, Coupland LJ: **The increasing application of multiplex nucleic acid detection tests to the diagnosis of syndromic infections.** *Epidemiol Infect* 2014, **142**(1):1-11.
121. Bauer KA, Perez KK, Forrest GN, Goff DA: **Review of rapid diagnostic tests used by antimicrobial stewardship programs.** *Clin Infect Dis* 2014, **59** Suppl 3:S134-145.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Colin MacKenzie für seine Anregungen, sein Vertrauen, seine Geduld und nicht zuletzt all die nicht-wissenschaftlichen Gespräche, in denen sein Verständnis für die Vielseitigkeit des Lebens stets zu spüren war.

Zudem danke ich dem gesamten Laborteam des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, allen voran Raquel Guadarrama Gonzalez und Meike Rosenblatt, für die tolle Anleitung, die kurzweiligen Pausengespräche und das immerwährende Interesse an den Fortschritten meiner Arbeit.