

Aus dem Charité Centrum 5
Institut für Mikrobiologie und Hygiene, CCM/CBF
Direktor: Professor Dr. Dr. U. B. Göbel

Habilitationsschrift

***In situ* Verfahren zum molekulargenetischen Erregernachweis und zur Analyse medizinisch relevanter Biofilme**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Mikrobiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. Annette Moter
geboren am 10. August 1965 in Köln

Eingereicht: Juli 2010

Dekanin: Professorin Dr. Annette Grütters-Kieslich

1. Gutachter: Dr. Robert J. Palmer Jr.

2. Gutachter: Professor Dr. Dag Harmsen

PUBLIKATIONEN
auf denen diese Schrift basiert

Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D, Siemoneit S, Mallmann C, Halle E, Göbel UB, **Moter A**. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32 Suppl 1:S51-59.

Gescher DM, Mallmann C, Kovacevic D, Schmiedel D, Borges AC, Schweickert B, Göbel UB, **Moter A**. A view on Bartonella quintana endocarditis--confirming the molecular diagnosis by specific fluorescence in situ hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60(1):99-103.

Lefmann M, Schweickert B, Buchholz B, Göbel UB, Ulrichs T, Seiler P, Theegarten D, **Moter A**. Evaluation of Peptide Nucleic Acid-Fluorescence In Situ Hybridization for Identification of Clinically Relevant Mycobacteria in Clinical Specimens and Tissue Sections. *J Clin Microbiol* 44, *J Clin Microbiol*. 2006;44(10):3760-7.

Moter A, Hoenig C, Choi BK, Riep B, Göbel UB. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1399-1403.

Wecke J, Kersten T, Madela K, **Moter A**, Göbel UB, Friedmann A, Bernimoulin J. A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett* 2000;191:95-101.

Moter A, Leist G, Rudolph R, Schrank K, Choi BK, Wagner M, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology* 1998; 144 (Pt 9):2459-2467.

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
Bp	Basenpaare
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DD	Dermatitis Digitalis
DNA	Desoxyribonukleinsäure (für englisch desoxyribonucleic acid)
dUTP	2'-Desoxyuridin, 5'-Triphosphat
EMBL	The European Molecular Biology Laboratory
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen (für englisch extracellular polymeric substances)
e-PTFE	Polytetrafluoroethylen
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAP	Generalisierte Aggressive Parodontitis
GenBank-NCBI	Die Sequenzdatenbank des nationalen Zentrums für Biologische Informationen der USA (A database of nucleotide sequences maintained by the US National Center for Biology Information)
IE	Infektiöse Endokarditis
MALDI-TOF	Massenspektrometrie (für englisch matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight)
mRNA	Boten- Ribonukleinsäuren (für englisch messenger RNA)
ml	Milliliter
MOTT	nicht-tuberkulöse Mykobakterien (für englisch mycobacteria other than tuberculosis)

MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex (für englisch mycobacterium tuberculosis complex)
NAT	Nukleinsäure Amplifikations Techniken
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (für englisch phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (für englisch polymerase chain reaction)
PNA	Peptid-Nukleinsäuren (für englisch peptide nucleic acids)
RNA	Ribonukleinsäuren (für englisch ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäuren
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
TUNEL	Terminal Transferase vermittelte End-Markierung mit dUTP zur Darstellung apoptotischer Zellkerne (für englisch Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Anwendungen für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung in der klinischen Mikrobiologie	2
1.2. Biofilme	3
1.3. Fragestellung und Zielsetzung	5
2. Ergebnisse und Diskussion	6
2.1. Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung für den Nachweis von Mikroorganismen	6
2.2. <i>In situ</i> Erregernachweis in der Infektionsdiagnostik	13
2.2.1. FISH zur schnellen molekularbiologischen Erregerdifferenzierung am Beispiel der Sepsis	13
2.2.1.1. Fluorescence <i>in situ</i> hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures.	18
2.2.1.2. Zusammenfassung	27
2.2.1.3. Ausblick	27
2.2.2. FISH zum <i>in situ</i> Erregernachweis schwer kultivierbarer Bakterien am Beispiel der Endokarditis	28
2.2.2.1. A view on <i>Bartonella quintana</i> endocarditis--confirming the molecular diagnosis by specific fluorescence <i>in situ</i> hybridization.	32
2.2.2.2. Zusammenfassung	37
2.2.2.3. Ausblick	37
2.2.3. FISH zum <i>in situ</i> Erregernachweis langsam wachsender Spezies am Beispiel der Mykobakterien Diagnostik	40
2.2.3.1. Evaluation of Peptide Nucleic Acid-Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization for Identification of Clinically Relevant Mycobacteria in Clinical Specimens and Tissue Sections.	44
2.2.3.2. Zusammenfassung	52
2.2.3.3. Ausblick	52
2.3. Analyse komplexer mikrobieller Biofilme	54
2.3.1. Nachweis bisher nicht kultivierter Mikroorganismen in Biofilmen am Beispiel der Parodontitis	54
2.3.1.1. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease.	59
2.3.1.2. Zusammenfassung	64

2.3.2.	FISH für die Analyse oraler Biofilme	65
2.3.2.1.	A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets.	70
2.3.2.2.	Zusammenfassung	77
2.3.2.3.	Ausblick	77
2.3.3.	FISH für die Analyse von Biofilm-Wirt Interaktionen am Beispiel der Dermatitis digitalis	80
2.3.3.1.	Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions.	83
2.3.3.2.	Zusammenfassung	92
2.3.3.3.	Ausblick	92
3.	Synopsis	94
4.	Literatur	95
5.	Danksagung	102
6.	Erklärung	104

1. Einleitung

Die wichtigste Aufgabe der medizinischen Mikrobiologie ist die Isolierung und Identifizierung humanpathogener Organismen. Für die korrekte Wahl der Antibiotikatherapie und somit für die Prognose des Patienten ist eine schnelle, sensitive und spezifische Erregerdiagnostik von größter Wichtigkeit. Dabei sind die kulturellen Verfahren mit Anzucht der Infektionserreger auf festen oder in flüssigen Nährmedien zur Isolierung und Anreicherung individueller Spezies mit nachfolgender biochemischer Differenzierung ein fester Bestandteil der Routinediagnostik. Bereits kurz nach Probeneingang kann ein gefärbtes Direktpräparat wertvolle Hinweise für die initiale Therapieempfehlung geben. Nach erfolgreicher Anzucht folgt nach ein bis drei Tagen eine präzisere Erregerdifferenzierung. Auch für die Erstellung von Antibiotogrammen ist bisher die Isolierung auf Nährmedien Voraussetzung. Somit sind diese Verfahren fest etabliert und bilden bisher für die meisten Infektionserreger den Goldstandard der Infektionsdiagnostik.

Viele Mikroorganismen sind jedoch schwer oder bisher nicht kultivierbar (4). Die Nährstoffbedürfnisse dieser anspruchsvollen Spezies sind zu spezifisch und komplex, um sie unter Laborbedingungen zu kultivieren. Andere Spezies wachsen zu langsam, um eine zeitnahe Erregeridentifikation zu ermöglichen. Auch für die Untersuchung von Probenmaterial von antibiotisch vorbehandelten Patienten sind kulturell basierte Techniken oft ungeeignet.

Hier werden zunehmend molekularbiologische Verfahren eingesetzt, da sie das genetische Material der Mikroorganismen kulturunabhängig nachweisen. Die meisten Verfahren benutzen dabei einen Amplifikationsschritt und werden somit als Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT) zusammengefasst. Die am weitesten verbreitete NAT ist die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) mit nachfolgender Hybridisierung oder Sequenzierung.

Ein Gen, welches sich zur molekularbiologischen Differenzierung von Bakterien besonders gut eignet, ist das 16S rRNA-Gen. Die ribosomale RNA der Bakterien ist hochkonserviert und ein phylogenetischer Marker (121). Sie besitzt Bereiche, die bei allen Bakterien identisch sind, sowie variable und hypervariable Bereiche, die eine Identifikation auf Genus- oder Speziesebene erlauben. Somit kann man PCR-Primer und Sonden auf verschiedenen taxonomischen Ebenen entwickeln (39, 4).

Ein Nachteil der meisten molekularbiologischen Methoden ist es jedoch, dass sie keine Information über räumliche Verteilung der Mikroorganismen zueinander oder im Kontext mit dem Gewebe erlauben. Somit sind insbesondere die hochsensitiven NAT

kontaminationsanfällig und positive Nachweise von Krankheitserregern können nur unter Berücksichtigung klinischer Befunde interpretiert werden.

Hier findet die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ihre Anwendung, bei welcher fluoreszenz-markierte Oligonukleotidsonden spezifisch an komplementäre RNA-Sequenzen im Bakterium binden. Sie erlaubt somit die Visualisierung und gleichzeitig kulturunabhängige Identifikation von Mikroorganismen in ihrem natürlichen Habitat und bildet somit die Brücke zwischen Molekularbiologie, Mikrobiologie und Pathologie.

1.1. Anwendungen für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in der klinischen Mikrobiologie

- **Schnelle Identifikation bei mikroskopischem Erregernachweis im Gram-Präparat:** Bei mikroskopisch positiven Materialien kann mit Hilfe der FISH innerhalb von 3 Stunden eine Erregeridentifikation durchgeführt werden. Hierfür ist ein der Verdachtsdiagnose entsprechendes FISH-Sondenspektrum nötig. In dieser Arbeit wird die Anwendung der FISH für die rasche Differenzierung von Gram-positiven Kokken in Blutkulturen vorgestellt und diskutiert (37).
- **Erregernachweis bei Infektionen durch schwer oder bisher nicht kultivierbare Spezies:** Da die FISH eine molekularbiologische, kulturunabhängige Methode ist, kann sie auch Mikroorganismen detektieren, bei denen die konventionellen kulturellen Verfahren nicht erfolgreich sind. Als Beispiele werden hier die Endokarditis durch *Bartonella quintana*, *Mycobacterium leprae* als Erreger der Lepra und orale Treponemen vorgestellt (79, 67, 38).
- ***In situ* Nachweis von Mikroorganismen im Gewebe:** Ein entscheidender Vorteil der FISH ist die Möglichkeit der räumlichen Auflösung durch ihre Applikation an histologischen Schnitten. Dies bietet die Möglichkeit, zwischen Kontamination, Besiedlung oder invasiver Infektion zu unterscheiden und die Pathogenese von Infektionskrankheiten zu untersuchen. Diese Möglichkeit wird in den Arbeiten zum Nachweis von Mykobakterien in Geweben, bei der Endokarditis und in der Arbeit zur Dermatitis digitalis beim Rind genutzt (80, 67, 73).

- **Analyse komplexer mikrobieller Biofilme:** Das Potential der FISH, verschiedene Spezies gleichzeitig visualisieren zu können, macht die Technik zu einem wertvollen Instrument für die Biofilm-Forschung. Die Zusammensetzung, Organisation und Architektur medizinischer Biofilme lässt sich in idealer Weise mit der FISH darstellen, welche im Rahmen dieser Arbeit für die Anwendung an histologischen Schnitten optimiert wurde. Dieses wird für die Endokarditis und Parodontitis beim Menschen und Dermatitis digitalis des Rindes erläutert (118, 81, 38).

1.2. Biofilme

Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass die natürliche Lebensform der meisten Bakterien nicht das einzelne, planktonische Vorkommen ist, sondern dass sie vielmehr in komplexen, sessilen Lebensgemeinschaften, so genannten Biofilmen existieren (27, 44). Bakterielle Biofilme sind nicht nur in der Umwelt relevant, sondern gewinnen auch im medizinischen Bereich eine zunehmend größere Bedeutung (28, 87, 43). Beispiele für medizinische Biofilm-Erkrankungen sind infizierte Prothesen, die katheterassoziierte Sepsis, die Besiedlung der Lunge von Patienten mit zystischer Fibrose mit *Pseudomonas* spp., Otitis media, Endokarditis und Parodontitis. Häufig handelt es sich bei Biofilm-Infektionen um chronische Erkrankungen und ein typisches Merkmal sind die -besonders langfristig- oft unbefriedigenden Behandlungserfolge durch Antibiotikatherapie (21, 87, 43).

Die Analyse bakterieller Populationen in Biofilmen stellt mittlerweile ein eigenständiges Forschungsgebiet dar. Biofilme werden definiert als in eine Matrix eingeschlossene 3-dimensionale Populationen von Bakterien, die entweder untereinander oder an einer Oberfläche adhären (21). Bakterien in Biofilmen weisen gegenüber planktonischen Zellen desselben Stammes Unterschiede bezüglich der Wachstumsrate und Genexpression auf (28) (32, 31).

Biofilme bieten den Mikroorganismen entscheidende Vorteile gegenüber dem planktonischen Lebensstil:

Exopolysaccharidmatrix: Ein wesentlicher Bestandteil des Biofilms wird durch die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) gebildet, die 50 bis 95% seines Trockengewichts ausmachen können. Die EPS besteht aus Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren und spielt für die Bakterien eine entscheidende Rolle für

ihre Ernährung, Antibiotikaresistenz und Abwehr gegenüber dem Immunsystem. Viele, jedoch nicht alle Bakterien, die in den Biofilmen vorkommen, können diese EPS synthetisieren, weitaus weniger Spezies sind zudem in der Lage, die EPS zu verstoffwechseln. Die extrazellulär exprimierten EPS können mitunter die Zellen ummanteln und als Adhäsionsrezeptoren fungieren. Diese gesamte Biofilmmatrix ist einer ständigen Umwälzung unterworfen (30, 29).

Antibiotikaresistenz: Die Ursachen für die geringe Wirksamkeit der antimikrobiellen Agenzien auf die Keime eines Biofilms ist derzeit noch nicht geklärt. So wird einerseits eine limitierte Diffusion in den Biofilm angenommen. Die EPS binden einige Substanzen bereits an der Biofilmoberfläche und lassen eine Diffusion in die tieferen Schichten nicht zu. Die Wirksamkeit der Präparate hängt jedoch andererseits auch von der Teilungsgeschwindigkeit der Keime ab. Diese kann innerhalb des Biofilms sehr unterschiedlich sein. Auch die Existenz von sogenannten Persister- Zellen, welche in einem lebensfähigen aber metabolisch inaktiven Zustand verharren, kann die erhöhte Antibiotikaresistenz der Biofilme erklären (69). Wahrscheinlich spielen jedoch mehrere dieser Faktoren sowie die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen antimikrobieller Substanzen eine Rolle (106, 107, 48).

Nahrungsketten: Die Mikroorganismen, die in den Biofilmen organisiert sind, besitzen nicht nur bessere Abwehrmechanismen und Überlebenschancen, sie haben auch eine erhöhte metabolische Effizienz. Die Substratzufuhr erfolgt nicht nur mit der Nahrungsaufnahme des Wirts, sondern gerade die oralen Biofilme beziehen ihre Versorgung aus dem Speichel und dem Sulkusfluid. Eine Vielzahl von Enzymen, die von verschiedenen Bakterien produziert werden, bereiten komplexe Strukturen wie z.B. die Mucine in einem auf einander aufbauenden Stoffwechselprozess auf, deren Bestandteile anschließend den einzelnen Keimen zur Verstoffwechslung zur Verfügung stehen. Diese kaskadenartige Degradation der Nahrungsbestandteile in den Biofilmen stellt einen weiteren wesentlichen Unterschied zu den Monokolonien einzelner Bakterienspezies dar (10)

Quorum sensing: Neben dem gegenseitigen Profitieren im Stoffwechsel wird weiterhin beschrieben, dass auch die Regulation einzelner Gene aktiv durch die ‚Kommunikation‘ zwischen verschiedenen Bakterienpopulationen mittels Botenstoffen erfolgt; dieser Vorgang wird als *Quorum sensing* bezeichnet und findet auch über Speziesgrenzen hinweg statt (35, 34).

Diese komplexen Eigenschaften der Biofilme bieten den Mikroorganismen vielfältige ökologische Nischen. Im menschlichen Körper haben zudem noch immunologische

und genetische Faktoren, sowie Sauerstoffsättigung, Temperatur und mechanische Effekte einen entscheidenden Einfluss auf den Aufbau und die Effizienz der Biofilme. Es wird deutlich, dass solche Habitate zu komplex sind, um sie *in vitro* unter Laborbedingungen zu imitieren. Die kontrollierten Bedingungen experimenteller Biofilmforschung, wie Durchflusskammern, Chemostate oder Tropf-Reaktoren können jedoch einzelne Zusammenhänge aufdecken und Aufschluss über Biofilmmechanismen geben (93). Die Relevanz dieser Ergebnisse für die klinische Situation kann aber letztlich nur durch *in situ* Analyse von *in vivo* gewachsenen Biofilmen bestätigt werden.

1.3. Fragestellung und Zielsetzung

Die im Folgenden besprochenen Arbeiten sollen exemplarisch die Anwendung von FISH zur schnellen und spezifischen Erregerdiagnostik darstellen. Des Weiteren wurde diese Technik durch die Etablierung an histologischen Schnitten für die *in situ* Darstellung von Bakterien am klinischen Material nutzbar gemacht. Dadurch ermöglicht sie die räumliche Darstellung vom Infektionsgeschehen und kann wertvolle Informationen zur Architektur von Biofilmen auf Oberflächen, am oder im Wirtsgewebe sowie zur Pathogenese von Infektionskrankheiten liefern.

2. Ergebnisse und Diskussion

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) nimmt eine zentrale Rolle in dieser Habilitationsschrift ein, weil die Optimierung der Methode und ihre Weiterentwicklung für die Anwendung in der Praxis einen entscheidenden Fortschritt in der medizinischen Mikrobiologie darstellen. Daher wird die Beschreibung der FISH hier vorangesetzt und auf die redundante Erläuterung der Technik bei der Besprechung der einzelnen Publikationen verzichtet.

2.1. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung für den Nachweis von Mikroorganismen

Die FISH ist eine vielseitige Methode, die in der Umweltbiologie und Humangenetik entwickelt wurde und dort bereits viele Jahre ausgiebig genutzt wird und fest etabliert ist (4, 115). Für die Anwendung in der Biofilmforschung und in der medizinischen Mikrobiologie wurde die FISH sehr viel später entdeckt und findet erst in den letzten Jahren zunehmend Verbreitung (78, 98).

Das Prinzip der FISH beruht auf Oligonukleotidsonden, welche an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Diese Sonden binden sequenzabhängig an die entsprechende Zielstruktur in den fixierten, morphologisch intakten Bakterien (Abb. 1).

Fixierung: Für die Fixierung von Mikroorganismen oder Geweben eignen sich grundsätzlich alle Verfahren, die auch für die Herstellung mikroskopischer Ausstrichpräparate oder histologische Schnittpräparate verwandt werden. Beste Ergebnisse werden durch Fixierung in Formaldehyd oder Paraformaldehyd (3,7%) in gepuffertem PBS erreicht. Allerdings führt die Formaldehydfixierung bei Gram-positiven Bakterien zu einer Quervernetzung der Zellwand, so dass eine ungehinderte Penetration der FISH-Sonden erschwert und zum Teil sogar ganz verhindert wird. Daher ist für Gram-positive Erreger eine Fixierung mit Ethanol oder Methanol günstiger. Grundsätzlich ist jedoch für eine erfolgreiche Hybridisierung von Gram-positiven Spezies eine enzymatische Vorbehandlung vor Aufbringen des Hybridisierungspuffers nötig. Sie erfolgt für Streptokokken und Enterokokken mit Lysozym, und für Staphylokokken und Actinomyceten zusätzlich mit Lysostaphin (78, 37).

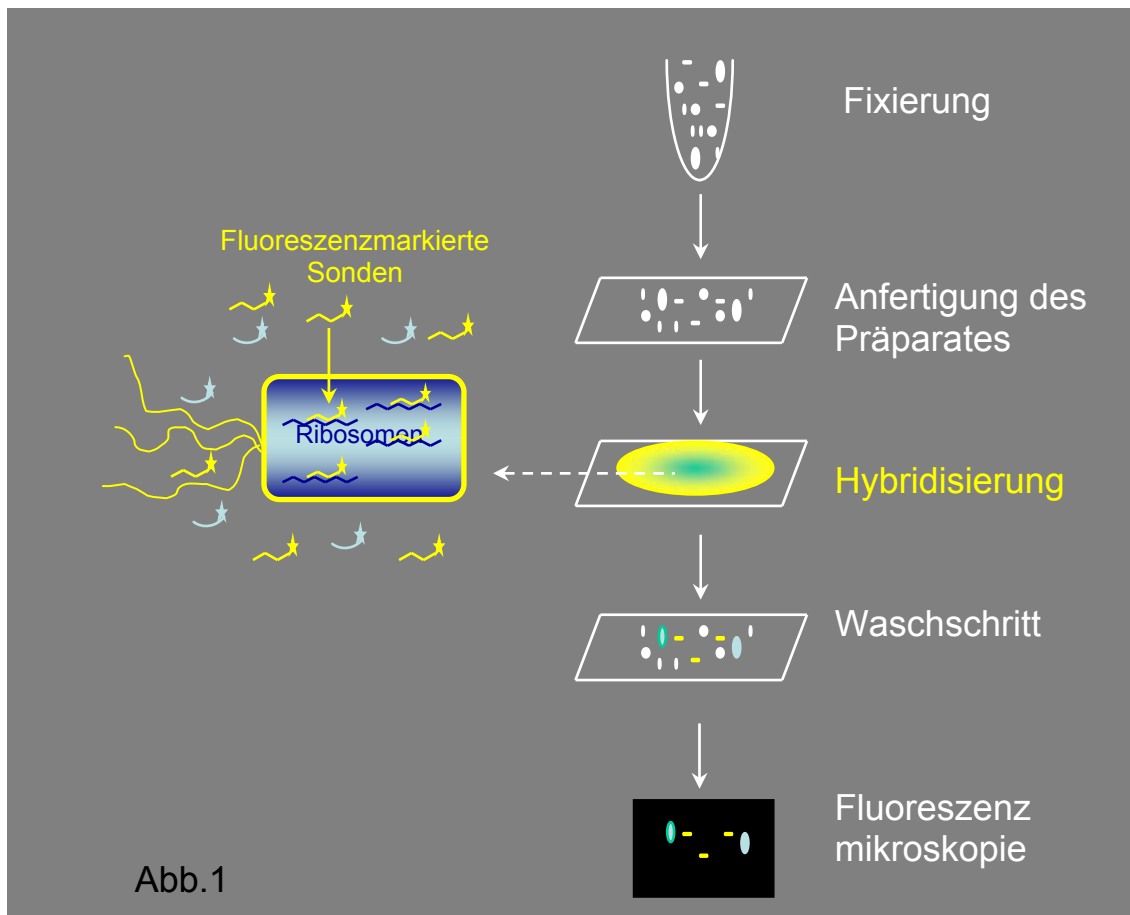


Abb. 1: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei der FISH (nach Moter und Göbel 2000 (78))

Herstellung des mikroskopischen Präparates: Bakterienkulturen oder klinische Materialien können wie in der mikrobiologischen Routinediagnostik üblich als Tropf- oder Tupf- bzw. Ausstrichpräparat auf einen Objektträger aufgebracht werden. Allerdings verliert man bei derartigen Präparaten die Information über die räumliche Organisation der Mikroorganismen in Biofilmen oder Geweben. Daher war ein Ziel unserer Arbeit, die FISH für die Anwendung an Gewebsschnitten zu optimieren. Ein Grund für die zurückhaltende Nutzung der FISH an histologischen Schnitten war die schlechte Qualität der FISH-Präparate bei Paraffin- oder Gefrierschnitten. Eine hohe Hintergrund-Fluoreszenz und unscharfe Strukturen bei der für Mikroorganismen nötigen 1000x Vergrößerung erschwerten die Detektion einzelner Bakterien und führten zu unbefriedigenden Ergebnissen. Durch die Einbettung in Kunstharz, einem kalt polymerisierenden Methacrylat (Technovit 8100, Kulzer) konnten die FISH-Ergebnisse deutlich verbessert werden (80). Das Material hat den Vorteil, durch seine Härte auch das Schneiden von harten, verkalkten oder verhornten Geweben am Rotationsmikrotom mit einer definierten Schnittdicke von 2µm zu ermöglichen. Zudem konnten die FISH-Sonden ohne weitere Vorbehandlung (wie Entparaffinierung)

ungehindert in das Material eindringen und spezifisch hybridisieren. Die Zielstruktur der FISH, die ribosomale RNA (rRNA) zeigte sich nach Methacrylat-Einbettung außergewöhnlich stabil. Einmal eingebettete Proben waren auch nach 6 Jahren Lagerung bei 4°C unverändert gut für die FISH benutzbar.

Sondendesign: Die am häufigsten benutzte Zielstruktur für die FISH ist die 16S rRNA; aber auch die 23S rRNA, das Zwischenstück zwischen 16S und 23S rRNA, sowie mRNA wurden erfolgreich für die FISH genutzt. Die rRNA eignet sich deswegen sehr gut für den Nachweis von Mikroorganismen, weil sie in jedem bekannten, wie auch unbekanntem Bakterium in hoher Kopiezahl vorkommt, solange die Bakterienzelle vital ist. Durch ihre evolutionär konstanten und variablen Bereiche bildet die 16S rRNA ein ideales Zielmolekül für das Design spezies- oder genus-spezifischer bzw. pan-bakterieller, d. h. fast alle Bakterien erfassender, Sonden. Zudem gibt es von dem kodierenden Gen die meisten Sequenzdaten in den öffentlich verfügbaren Datenbanken, wie GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>), die ‚Nucleotide Sequence Database‘ des ‚European Molecular Biology Laboratory‘ (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), das ‚Ribosomal Database project‘ (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) oder GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Eine typische Oligonukleotidsonde hat eine Länge von 20 bis 25 Basenpaaren. Die geeignete Bindungsstelle und somit Sequenz wird durch Datenabgleich möglichst vieler Sequenzen des Zielorganismus mit denen phylogenetisch nah verwandter Spezies ermittelt. Dabei muss auf die Vermeidung von Haarnadelstrukturen, Sonden-Dimeren und auf ein ausgewogenes Verhältnis der verschiedenen Nukleotide geachtet werden, um geeignete Hybridisierungsbedingungen zu ermöglichen. Bei dem Design neuer Sonden wird Bioinformatik-Software, wie BLASTN und FASTA-Funktionen des HUSAR Programm-Paketes (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, DKFZ, <http://genome.dkfz-heidelberg.de/>) oder die ARB Software (<http://www.arb-home.de>) benutzt. Für die Überprüfung der Sondenspezifität ist die Software probeCheck (<http://131.130.66.200/cgi-bin/probecheck/content.pl?id=home>) hilfreich. Bereits publizierte Sonden sind in der Datenbank ProbeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>) mit Informationen zu Hybridisierungsbedingungen und Originalpublikation hinterlegt.

Ist eine Sonde mit optimaler Sequenz entwickelt worden, kann sie kommerziell mit entsprechendem Fluoreszenzfarbstoff markiert bestellt werden.

Hybridisierung: Die Hybridisierung mit dem Sonden-Puffergemisch (Hybridisierungslösung) findet in einer dunklen, feuchten Kammer bei 45°C - 60°C statt. Die Hybridisierungslösung kann gleichzeitig verschiedene Sonden mit verschiedenen Fluorochromen enthalten. Es empfiehlt sich in der Regel, eine pan-bakterielle Sonde (z.B. EUB338 (3)), d.h. eine Sonde, welche die meisten aller bekannten Bakterien bindet, mitzuführen. Ein positives Signal mit der bakteriellen Sonde gewährleistet eine bezüglich rRNA Gehalt, Fixierung, Permeabilität und Hybridisierung gelungenes FISH-Experiment. Ebenso ist die simultane Hybridisierung mit einer Nonsense-Sonde (z.B. die der EUB338 komplementären Sonde NON-EUB338, welche keine Bindungsstelle in allen bekannten Bakterien aufweist(117)) hilfreich, da sie unspezifische Bindung von Oligonukleotiden an organischem Material oder degradierten Nukleinsäuren ausschließen kann.

Weiterhin empfiehlt sich die Kombination mit einem unspezifischen Farbstoff wie 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Das fluoreszierende DAPI interkaliert in die DNA-Helix und färbt somit Bakterien und Zellkerne. Dies erlaubt die unspezifische Visualisierung der Mikroorganismen und die Orientierung im Gewebe.

Nach einem Waschschrift wird das Präparat mit Eindeckmedium und Deckglas versehen und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Das Eindeckmedium sollte für Fluoreszenzmikroskopie geeignet sein und eine Substanz enthalten, welche das Ausbleichen der Fluorochrome unter dem Fluoreszenzmikroskop verhindert.

Mikroskopie: Für die Auswertung der FISH-Präparate eignet sich jedes Epifluoreszenzmikroskop. Bei Verwendung mehrerer Fluorochrome muss es mit entsprechenden Bandpass-Filtersätzen ausgerüstet sein, die die saubere Trennung der Fluoreszenzsignale ermöglichen. Für die Aufnahme von Mikrofotografien stehen heute sensitive digitale Kamerasysteme mit entsprechender Software zur Verfügung. Motorisierte Mikroskopierteische erlauben auch am Epifluoreszenzmikroskop die Aufnahme von Bildstapeln, welche einen räumlichen Eindruck vermitteln. Dekonvolutions-Software oder eine Apotom-Einrichtung sind zusätzliche Erweiterungen des Mikroskops, die weitere Bildinformationen und dreidimensionale Darstellungen ermöglichen. Noch anspruchsvoller und Fragestellungen in der Forschung vorbehalten ist die Benutzung eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops. Der große Vorteil der konfokalen Lichtmikroskopie ist die Möglichkeit, das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene zu sammeln. Eine Lochblende, die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, sorgt dafür, dass

sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, auch nicht vom Detektor erfasst werden kann.

Sondenevaluation: Stringente Hybridisierungsbedingungen sind für den spezifischen Nachweis von Mikroorganismen unbedingte Voraussetzung und müssen für jede neu entwickelte Sonde ermittelt werden. Hierfür werden sowohl der Zielorganismus, als auch ein phylogenetisch nah verwandter Stamm mit möglichst wenigen Fehlpaarungen an der Sondenbindungsstelle (im Idealfall eine Fehlpaarung) parallel hybridisiert. Als Beispiel sei hier die Optimierung der FISH-Sonde RE-WHIP3 zum Nachweis von *Tropheryma whipplei* gezeigt (aus: (73), supporting information) (Tabelle 1).

FISH-Sonde	16S rRNA-Gensequenz (Orientierung)	Anzahl an Fehl- paarungen	Ziel- Organismus	GenBank Nummer
RE-WHIP3	ACCATGTCTCCCAACGTTAT (3`- 5`)			
	TGGTACAGAGGGTTGCAATA (5`- 3`)	0	<i>T. whipplei</i>	AF251035
	TGGTACAGAGGGTTGCGATA (5`- 3`)	1	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	X80504

Tabelle 1: Sequenzabgleich der *T. whipplei* spezifischen Sonde RE-WHIP3 mit *Actinomyces odontolyticus*, dem phylogenetisch nächsten Verwandten an der Sondenbindungsstelle.

Durch Erhöhen der Hybridisierungstemperatur oder Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer wird die Stringenz schrittweise gesteigert, bis nur noch der gewünschte Stamm, nicht aber die Negativkontrolle in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar ist. Um die Signalintensität der Positiv- und Negativkontrollen zu objektivieren, wird die Software ‚daime‘ (<http://www.microbial-ecology.net/daime/>) benutzt, die eigens für den Zweck der digitalen Bildauswertung von FISH-Aufnahmen entwickelt wurde (22) (Abbildungen 2 und 3).

Die entsprechenden Positiv- und Negativ-Kontrollen sollten in jedem FISH-Experiment mitgeführt werden, um die Spezifität der aktuellen Hybridisierung zu kontrollieren.

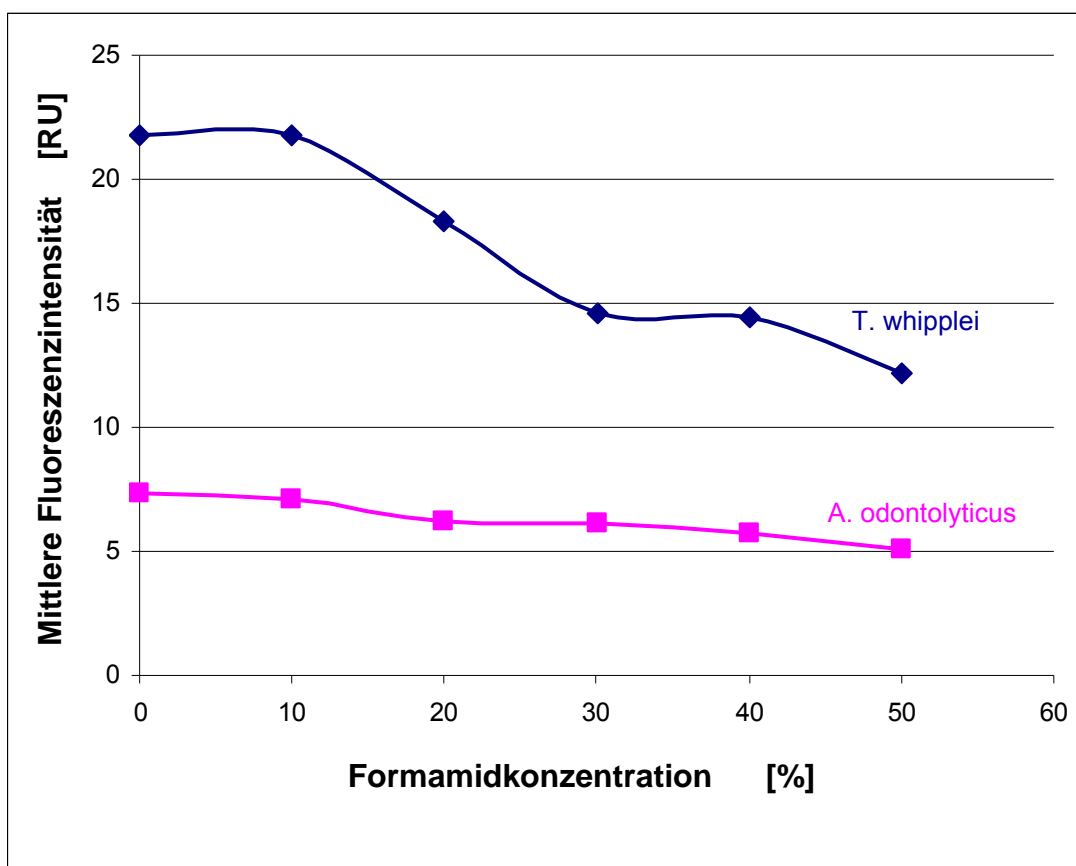


Abb. 2: Optimierung der Hybridisierungsbedingungen für RE-Whip 3

Fixierte Kulturen von *T. whipplei* und *A. odontolyticus* wurden mit der Sonde RE-Whip3 bei aufsteigenden Formamidkonzentrationen im Hybridisierungsmix hybridisiert. Die FISH-Signalintensitäten (Relative fluorescent Units, RU) wurden mittels daime Software ermittelt. Während die Fluoreszenzintensität von *A. odontolyticus* (magenta) durch unspezifische Bindung unter einem Wert von 10 RU bleibt, zeigt sich für *T. whipplei* (blau) eine deutliche Fluoreszenz bis zu einer Formamidkonzentration von 10% (vol/vol). Weitere Steigerung der Formamidkonzentration führt auch bei *T. whipplei* zu einem deutlichen Abfall der Fluoreszenzintensität und damit der Sensitivität der FISH (73).

geschützt

Abb.3: Spezifität der FISH Experimente

Hybridisierung fixierter *T. whipplei* Kulturen (A und C) und *A. odontolyticus* (B und D) mit der pan-bakteriellen Sonde EUB338_{FITC} (A und B) und RE-Whip3_{Cy3} (C und D). Während die Sonde EUB338 beide Stämme detektiert, sind nur bei *T. whipplei* Signale mit der spezifischen Sonde im identischen mikroskopischen Gesichtsfeld zu sehen(73).

So können die Bakterien nicht nur in ihrem natürlichen Habitat visualisiert, sondern auch identifiziert werden. Durch die Kombination spezifischer Sonden mit verschiedenen Fluoreszenz-Markierungen sind auch mehrere Populationen simultan darstellbar. FISH ist somit ein ideales Instrument für die *in situ* Analyse von komplexen Habitaten und Biofilmen (78).

2.2. In situ Erregernachweis in der Infektionsdiagnostik

2.2.1. FISH zur schnellen molekularbiologischen Erregerdifferenzierung am Beispiel der Sepsis

Neben der Erforschung komplexer mikrobieller Habitats findet die FISH zunehmend Anwendung in der mikrobiologischen Diagnostik. So wurde sie erfolgreich für die Differenzierung von Erregern in positiven Blutkulturen eingesetzt. Bei der Sepsis ist eine schnelle und möglichst gezielte antimikrobielle Therapie von entscheidender Bedeutung für die Prognose des Patienten (82). Eine schnelle Erregeridentifikation kann nicht nur den Einsatz von Breitspektrum Antibiotika reduzieren, sondern auch die Nebenwirkungen von Therapiekombinationen minimieren und Resistenzentwicklung der Bakterien verhindern und so zum prognostisch und ökonomisch optimalen Patientenmanagement beitragen. Neben der Fokussuche ist daher die Entnahme von Blutkulturen die wichtigste diagnostische Maßnahme. Wenn der Blutkulturautomat Wachstum signalisiert, wird zeitnah ein Grampräparat zur groben Einordnung des Erregers durchgeführt. Es folgt die Kultivierung über Nacht mit anschließender biochemischer Differenzierung. So werden bis zur endgültigen Speziesidentifikation und Resistenztestung in der Regel mindestens 2 Tage benötigt. Mit der FISH kann bereits in weniger als 3 Stunden nach dem Wachstumssignal eine Speziesdifferenzierung herbeigeführt werden, welche wertvolle Hinweise für eine frühzeitige Therapieanpassung liefern kann (55, 54, 100).

Die häufigsten Gram-positiven Isolate aus Blutkulturen sind *Staphylococcus* spp. gefolgt von *Enterococcus* spp. und *Streptococcus* spp. (119, 82, 6, 65).

In der im Folgenden beschriebenen Studie konnten wir ein umfassendes FISH-Sondenspektrum für die Sepsisdiagnostik von Gram-positiven Kokken etablieren. Ziel war es, insbesondere *S. aureus* von koagulasenegativen Staphylokokken, *Enterococcus faecium* von *Enterococcus faecalis* und *Streptococcus pneumoniae* von anderen Streptokokken zu differenzieren. Hierfür wurde ein Set von zehn FISH-Sonden entwickelt, welches bereits publizierte Sonden mit Sonden kombiniert, welche im Rahmen dieser Studie entwickelt und optimiert wurden (Tabelle 2).

Sonde	Spezifität	Referenz
EUB338	die meisten der bekannten Bakterienspezies	(3)
NON-EUB338	Keine der bekannten Bakterienspezies	(117)
STAPHY	<i>Staphylococcus</i> spp.	(112)
SAU	<i>S. aureus</i>	(55)
STREP1	<i>Streptococcus</i> spp., ausgenommen die durch STREP2 detektierten	(112)
STREP2	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. mitis</i> -Gruppe : <i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. peroris</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. gordonii</i>	Diese Studie
ENCO	<i>Enterococcus</i> spp., ausgenommen <i>E. faecalis</i>	Diese Studie
FMDUR	<i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i>	(74)
EFAEC	<i>E. faecalis</i> , <i>E. sulfureus</i> , <i>Granulicatella</i> spp.	(51)
GRANU	<i>Granulicatella</i> -Gruppe: <i>Granulicatella adiacens</i> , <i>G. para-adiacens</i> , <i>G. elegans</i> , <i>G. balaenopterae</i> , <i>Abiotrophia</i> <i>defectiva</i> , <i>Lactobacillus coleohominis</i>	Diese Studie

Tab 2: Zusammenstellung der FISH-Sonden für die Identifikation Gram-positiver Kokken in Blutkulturen.

Die pan-bakterielle Sonde EUB338 detektiert fast alle Bakterien und diente somit als Qualitätskontrolle der FISH. Sie wurde in jedem Hybridisierungsmix mitgeführt. Durch die nonsense Sonde NonEUB338 wurden Fehl-Hybridisierungen ausgeschlossen. Die Sonde STAPHY bindet an alle Mikroorganismen der Gattung *Staphylococcus*. Die spezies-spezifische Sonde SAU wurde eingesetzt, um *S. aureus* von den koagulasenegativen Staphylokokken abzugrenzen. Beide Sonden wurden für Blutkulturen eingesetzt, bei denen das Gram-Präparat Gram-positive Haufenkokken zeigte. Für Gram-positive Kettenkokken wurden die Sonden STREP1 und STREP2 für den Nachweis von Streptokokken bzw. *S. pneumoniae*/*S. mitis* eingesetzt. Des Weiteren wurde die Sonde ENCO entwickelt, um alle Enterokokken außer *E. faecalis* nachzuweisen. Letztere Spezies wurde von der Sonde EFAEC detektiert, welche zusätzlich *Granulicatella* spp. einschließt. Um die *Granulicatella* Gruppe von *E. faecalis* abzugrenzen, wurde die spezifische Sonde GRANU entwickelt. Für den spezifischen Nachweis von *E. faecium*/*E. durans* wurde die Sonde FMDUR benutzt.

Alle spezifischen Sonden wurden für die Anwendung zur Blutkulturdiagnostik optimiert und evaluiert. Hierfür wurden durch eine steigende Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer die stringenten Hybridisierungsbedingungen für jede Sonde ermittelt. Als Positivkontrolle dienten die entsprechenden Zielorganismen. Als Negativkontrollen wurden diejenigen Spezies benutzt, deren 16S rRNA-Gen im Sondenbindungsbereich die wenigsten Fehlpaarungen (im Idealfall nur eine Fehlpaarung) aufwiesen.

Erregerdifferenzierung in Blutkulturen

Von 428 positiven Blutkulturen, die im Präparat Gram-positive Kokken zeigten, wurden 1 ml Aliquots fixiert und verblindet mit der FISH untersucht. Dabei wurde ein diagnostischer Algorithmus eingehalten, der eine zeitsparende Identifikation der häufigsten Sepsiserreger erlaubte. So wurden bei Gram-positiven Haufenkokken zunächst die genus-spezifische Sonde für Staphylokokken und die *S. aureus*-spezifische Sonde kombiniert, während bei Kettenkokken mit den Streptokokken- und Enterokokken-spezifischen Sonden hybridisiert wurde. Das FISH-Ergebnis wurde mit der kulturellen und phänotypischen Identifikation verglichen sowie in diskrepanten Fällen durch PCR mit nachfolgender Sequenzierung des 16S rRNA-Gens überprüft.

In 334 Fällen wurden mittels FISH Staphylokokken nachgewiesen, davon in 73 Blutkulturen *S. aureus*. In 25 Proben identifizierte die FISH Streptokokken, in 2 Fällen *Granulicatella* spp. und in 49 Proben Enterokokken. Die FISH-Analysen erzielten eine

Sensitivität von 98,65% und eine Spezifität von 99,0% bei einem positiven Vorhersagewert von 98,77% und negativem Vorhersagewert von 98,91%.

Von 16 diskrepanten Ergebnissen konnten durch Sequenzierung in 10 Fällen die FISH-Ergebnisse bestätigt werden. Unter den verbleibenden sechs Fällen waren drei Proben, die korrekt als Staphylokokken identifiziert wurden, jedoch falsch negativ (2 Proben) bzw. falsch positiv (1 Probe) mit der *S. aureus*-spezifischen Sonde bewertet wurden. Eine weitere Probe mit koagulasenegativen Staphylokokken wurde falsch negativ mit der genus-spezifischen Sonde gewertet. Bei den zwei verbleibenden falsch identifizierten Proben handelte es sich um eine Fehl-Identifikation von *E. faecium* als *E. faecalis* und eine Blutkultur mit *Streptococcus anginosus*, die von der *Streptococcus*-Sonde falsch negativ getestet wurde.

Insgesamt wurden durch die FISH in 422 von 428 Blutkulturen die Gram-positiven Kokken schnell und präzise identifiziert, was im Vergleich zu konventionellen Verfahren eine Zeitersparnis von bis zu 48 Stunden bedeutet. Dabei waren der positive und negative prädiktive Wert mit 98,77% und 98,91% ausgesprochen hoch und vergleichbar mit denen anderer FISH-Studien zur Blutkulturdiagnostik (24, 51, 86, 85). Dabei umfasst die vorliegende Studie durch die Kombination von 8 Sonden das bisher umfassendste Keimspektrum. Bemerkenswert ist die korrekte Identifikation von *Granulicatella* spp., welche durch konventionelle Methoden fälschlich als vergrünende Streptokokken identifiziert wurde. Infektionen mit *Granulicatella* zeichnen sich durch eine deutlich höhere Morbidität und Mortalität aus als solche durch Streptokokken und Enterokokken. Sie soll für bis zu 6% aller Streptokokken Endokarditiden verantwortlich sein, wobei durch Probleme bei der Anzucht und Differenzierung dieser Gattung von höheren Zahlen bei Sepsis und Endokarditis ausgegangen werden muss (96, 5, 9, 20, 99). Therapeutisch hat die Diagnose einer *Granulicatella* Endokarditis große Implikationen, da es 46% Therapieversager gibt und eine sorgfältige Antibiotikatestung und individuelle Therapieempfehlung erfolgen sollte (113).

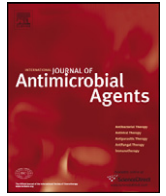
In den meisten publizierten Arbeiten zur FISH-Diagnostik wird das einzige kommerziell erhältliche FISH-Testsystem für die Sepsis-Diagnostik benutzt. Dieses enthält PNA (peptide nucleic acid) –Sonden, welche im Gegensatz zu Oligonukleotidsonden ungeladen sind und daher leichter in Gram-positive Mikroorganismen penetrieren können (86, 85, 100). Dadurch entfallen bei der PNA-FISH der enzymatische Zellaufschluß und somit zwei Pipettierschritte. Als Nachteil der PNA-FISH sind der hohe Preis der Sonden und die eingeschränkte Flexibilität beim Design neuer Sonden

zu nennen. Dennoch konnte durch die zeitnahe Erregeridentifikation eine Senkung der Mortalität und der Therapiekosten in Studien gezeigt werden (2, 71).

Beide FISH-Methoden sind im Vergleich zu Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) gleichermaßen schnell, preisgünstig und relativ simpel in der Durchführung. So kann auf die Rauntrennung, welche für ein kontaminationsfreies Arbeiten in der molekularbiologischen Diagnostik unerlässlich ist, verzichtet werden. Die apparative Ausstattung ist mit einem Fluoreszenzmikroskop, welches ohnehin in den meisten mikrobiologischen Laboren vorhanden ist, moderat. Auch ist die Fluoreszenzmikroskopie für technische Mitarbeiter, welche in der Beurteilung von Gram-Präparaten geschult sind, leichter zu erlernen als aufwendige Amplifikations-Techniken. Ein Vorteil der mittlerweile auch kommerziell erhältlichen NAT-Systeme ist allerdings ihre Anwendung direkt aus dem Blut der Patienten, ohne Vorkultur in Blutkulturflaschen (16, 116, 120). Der Zeitgewinn gegenüber der FISH für die Optimierung der Antibiotikatherapie ist bisher nicht untersucht. Auch für die Bestimmung der Senkung von Mortalität und Therapiekosten sind noch größere prospektive Studien nötig.

Beides gilt ebenfalls für die Anwendung von MALDI-TOF zur Sepsisdiagnostik. Das Verfahren ist ebenfalls schnell und simpel und könnte wie die FISH mit Blutkultur-positiven Materialien durchgeführt werden. Bisher liegen zwei Studien vor, bei der 95,3% von 170 (104) beziehungsweise 76% von 562 identifizierten Isolaten (62) korrekt identifiziert werden konnten.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass die FISH wie auch die NAT-Verfahren und MALDI-TOF zusätzliche Testsysteme in der Sepsisdiagnostik darstellen, welche bisher nicht die kulturelle Anzucht und Resistenztestung ersetzen können. Allerdings stellt die vorliegende Arbeit ein routinefähiges, preiswertes und schnelles Verfahren vor, um die meisten Gram-positiven Sepsiserreger wie Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken auf Genus-Ebene, und *S. aureus*, *S. pneumoniae/mitis*, *E. faecalis*, *Granulicatella* and *E. faecium/durans* auf Speziesebene sicher zu identifizieren. Die FISH kann so erheblich zur frühzeitigen Anpassung einer kalkulierten Antibiotikatherapie bei Patienten mit Sepsissyndrom beitragen.



Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures

Dorothee Maria Gescher*, Dragoljub Kovacevic, Dinah Schmiedel, Steffi Siemoneit, Christian Mallmann, Elke Halle, Ulf B. Göbel, Annette Moter

Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, Dorotheenstr. 96, D-10117 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Sepsis
Blood culture
In situ hybridisation
Gram-positive cocci

ABSTRACT

Sepsis is a life-threatening disease with a high mortality rate. Rapid identification of blood culture isolates plays a crucial role in adequate antimicrobial therapy in sepsis patients. To accelerate microbiological diagnosis, a comprehensive panel of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridisation (FISH) targeting Gram-positive cocci was compiled and evaluated on 428 positive blood culture specimens. By combining genus-specific and species-specific probes, the assay allowed discrimination of staphylococci, streptococci and enterococci as well as differentiation of therapy-relevant pathogens such as *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium/durans*. Furthermore, the newly designed FISH probes STREP2, ENCO and GRANU targeted *Streptococcus pneumoniae/mitis*, *Enterococcus* spp. (except *E. faecalis*) and *Granulicatella adiacens* group, respectively. The FISH assay achieved an overall sensitivity of 98.65% and a specificity of 99.0% and therefore allowed rapid and reliable molecular identification of Gram-positive cocci in blood culture specimens.

© 2008 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

Copyright
beim Verlag

2.2.1.2. Zusammenfassung

Bei der Therapie der Sepsis spielt die zeitnahe, gezielte Antibiotikatherapie eine entscheidende Rolle für die Prognose des Patienten. Eine Schlüsselrolle hierfür übernimmt daher die frühzeitige Erregeridentifikation. Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, ein umfassendes Sondenspektrum für die schnelle molekularbiologische Identifikation Gram-positiver Kokken in Blutkulturen zu entwickeln und zu evaluieren. Durch die Kombination von acht genus- oder spezie-spezifischen Sonden war es möglich, Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken zu unterscheiden, und therapie-relevante Pathogene wie *S. aureus*, *E. faecium/durans*, *Streptococcus pneumoniae/mitis* und *Granulicatella adiacens*-Gruppe zu identifizieren.

Einem diagnostischen Algorithmus folgend wurden 428 positive Blutkulturen mit Gram-positiven Kokken mittels FISH untersucht. Es ergab sich eine Sensitivität von 98,65% und eine Spezifität von 99,0%.

Die Handhabung der FISH ist im Vergleich zu anderen molekularen Verfahren einfach, schnell und kostengünstig. Obwohl sie derzeit weder die kulturelle Anzucht noch die Resistenztestung ersetzen kann, ist sie eine sinnvolle Ergänzung zur Sepsisdiagnostik. Eine Zeitersparnis von bis zu 48 Stunden bis zur Identifikation des Sepsiserregers kann wichtige Therapieentscheidungen bei kritisch kranken Patienten leiten und somit zur besseren Prognose aber auch verminderter Resistenzentwicklung und Kostendämpfung beitragen.

2.2.1.3. Ausblick

Eine Weiterentwicklung durch die Erweiterung des Sondenspektrums auf Gram-negative Erreger wäre wünschenswert. Ebenso könnte eine Automatisierung der Pipettierschritte erheblich zur Routinefähigkeit des Systems beitragen. Weiterhin konnte das FISH-Sondenpanel, welches für die Sepsisdiagnostik entwickelt worden war, für die Infektionsdiagnostik an Geweben genutzt werden, wie im Folgenden beschrieben wird.

2.2.2. FISH zum *in situ* Erregernachweis schwer kultivierbarer Bakterien am Beispiel der Endokarditis

Endokarditis

Die infektiöse Endokarditis (IE) ist eine immer noch lebensbedrohliche Erkrankung mit einer Mortalität von 15 bis 33% in Abhängigkeit vom Krankheitserreger (83, 47). Während die Mortalität stetig zurückgeht, ist die Inzidenz der IE in den USA und Westeuropa seit 25 Jahren auf dem gleichen Niveau von 3,6 pro 100.000 Personen verblieben (77, 111), oder für Patientinnen sogar gestiegen (25).

Duke's Klassifikation: Die Diagnose der IE bleibt schwierig, weil der Keimnachweis mit konventionellen Labormethoden zur Absicherung der Verdachtsdiagnose oft nicht möglich ist. Allgemein akzeptiert ist die modifizierte Klassifikation nach Duke (modified Duke classification (33, 70)), die mittlerweile als klinischer Standard zur Diagnosestellung eingesetzt wird. Sie unterteilt Hauptkriterien wie z. B. positive Blutkulturen während des Krankheitsverlaufes, in der Echokardiographie sichtbare Vegetationen an den Herzklappen, valvuläre Regurgitation und andere, sowie die Nebenkriterien Fieber, Vorhandensein von Risikofaktoren wie z. B. vorbestehender Klappenfehler (70). Entsprechend der Einteilung nach Duke erlauben morphologische Kriterien von Herzklappenschnitten auch die histologische Diagnose durch den Pathologen, die sich neben der unspezifischen Visualisierung mikrobieller Besiedelung auch auf die damit einhergehenden Entzündungs- und Umbauprozesse stützt (68). Neuerdings werden postoperativ molekularbiologische Methoden zum Nachweis einer Infektion der Herzklappen hinzugezogen (72). Die Einordnung der NAT bezüglich der Duke's Klassifikation wird noch diskutiert (108, 94).

Pathogene und mikrobiologische Diagnose: Haupterreger der infektiösen Endokarditis sind Streptokokken, Staphylokokken, vor allem *S. aureus* und bei immunsupprimierten Patienten koagulasenegative Staphylokokken (KNS), und Enterokokken (83). In zunehmendem Maße wird realisiert, dass auch empfindliche Keime, die nur schwer oder bisher nicht kultivierbar sind, einen beachtlichen Teil der IE verursachen (108, 84). Dies sind neben der Gram-negativen „HACEK“ Gruppe (*Aggregatibacter* spp., (bestehend aus *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens* und *Kingella* spp.), die Spezies *Abiotrophia* spp., *Brucella* spp., *Bartonella* spp., *Legionella* spp., *Tropheryma whipplei* und *Mycoplasma* spp., sowie intrazelluläre Organismen wie *Coxiella burnetii* (12, 13) .

Während die Inzidenz in den letzten Jahrzehnten unverändert geblieben ist, haben sich die zugrundeliegende Pathogenese, die Risikofaktoren und das Keimspektrum der IE

deutlich gewandelt. So steht nicht mehr der junge Patient mit rheumatischer Klappenerkrankung im Vordergrund, sondern zunehmend häufig ältere Patienten mit Grunderkrankungen und Endokarditisfälle, die mit medizinischen Eingriffen wie Operationen, Endoskopien und intravenöser Medikamentengabe oder aber Drogenmissbrauch in Verbindung stehen (77, 46, 111).

Die konventionelle mikrobiologische Diagnostik basiert im Wesentlichen auf dem positiven Keimnachweis in der Blutkultur, sowie post operationem an der exstirpierten Herzklappe bzw. an isolierten Emboli. Der spezies-spezifische Erregernachweis ist zur gezielten antibiotischen Therapie unerlässlich, gestaltet sich jedoch nicht selten schwierig. Die Natur der ‚Schwerkultivierbaren‘ ist ein häufiger Grund der ausgebliebenen mikrobiologischen Diagnose. Aber auch der grundsätzlich unkomplizierte Nachweis der erwähnten Hauptkeime bleibt problematisch, da bei Verdacht auf eine IE häufig unmittelbar eine empirische antibiotische Therapie eingeleitet wird, die die Mikroorganismen soweit schädigt bzw. in ihrer Stoffwechselaktivität beeinträchtigt, dass der überwiegende Teil der Blutkulturen bzw. Kulturen der exstirpierten Herzklappen kultur-negativ bleiben (56).

Bisherige diagnostische Methoden kommen hier an ihre Grenzen. Neuere, molekularbiologische und somit kulturunabhängige Methoden (NAT) sind hoch sensitiv. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass sie insbesondere bei der Untersuchung von Herzklappengewebe bei der kulturnegativen IE die ursächlichen Erreger detektieren können (40, 8, 36, 92, 114, 63, 11, 41, 60, 75). Allerdings unterscheiden sie nicht zwischen Kontamination und tatsächlicher Infektion und die Ergebnisse müssen mit Vorsicht interpretiert werden. Auch können mittels NAT noch Keime nachgewiesen werden, die bereits erfolgreich therapiert und nicht mehr vital sind (64, 97). Die Sequenzierung von Mischfloren ist in der Regel kaum möglich, die Anlage aufwendiger 16S-Klon-Bibliotheken überzieht den zeitlichen und finanziellen Rahmen einer diagnostischen Routinemethode. Die Ergebnisse dieser Techniken sind nicht nur teuer, sondern auch häufig unbefriedigend, da eine Aussage zur Relevanz der nachgewiesenen Spezies für die Kausalität der Erkrankung nur begrenzt möglich ist. Zudem bleiben sie bisher Laboratorien vorbehalten, die molekularbiologisch gut ausgerüstet und erfahren sind.

FISH für den Erregernachweis bei kulturnegativer Endokarditis: Da die FISH auf der einen Seite den kulturunabhängigen, molekularbiologischen Nachweis von Bakterien erlaubt, zum anderen die Erreger in Gewebsschnitten im histologischen Kontext visualisiert, scheint sie eine geeignete Methode, um bei der infektiösen Endokarditis diagnostisch eingesetzt zu werden. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel einer IE durch *Bartonella quintana* exemplarisch gezeigt.

Der 55-jährige Patient hatte eine 4-monatige Episode mit infektiösen Symptomen wie Fieber, Müdigkeit, Dyspnoe und letztlich akutem Nierenversagen unklarer Genese bevor ein Herzgeräusch den Verdacht einer IE nahelegte. Die Diagnose konnte durch ein transösophageales Echokardiogramm gesichert werden, welches eine schwere Aortenklappeninsuffizienz mit Vegetationen bis zu 23 mm zeigte. Auch die Mitralklappe wies kleinere Vegetationen auf. Weitere Untersuchungen ergaben eine Splenomegalie und vergrößerte mediastinale Lymphknoten. Eine empirische Antibiotikatherapie wurde mit Cefuroxim und Gentamicin für zwei Wochen begonnen. Nach einem Aortenklappenersatz und Rekonstruktion der Mitralklappe wurde die Therapie auf die Kombination von Doxycyclin und Erythromycin umgestellt. Der Patient konnte nach einem unkomplizierten postoperativen Verlauf entlassen werden.

Mikrobiologische Diagnostik: Alle acht untersuchten Blutkulturen blieben ohne Wachstum. Auch bei der kulturell angelegten Aortenklappe gelang kein Keimnachweis. Ein Stück der Aortenklappe wurde für die FISH-Analyse fixiert und zur Anfertigung von histologischen Schnitten in Methacrylat (Kunstharz) eingebettet. Um die Schnitte auf bakterielle Besiedlung zu untersuchen wurden sie gleichzeitig mit der bakteriellen Sonde EUB338 (3) und der nonsense Sonde NON-EUB338 (117) hybridisiert und mit dem unspezifischen Nukleinsäurefarbstoff DAPI gefärbt. In der Übersicht imponierten ausgedehnte Felder mit Verkalkungen. Bei höherer Auflösung zeigten sich Areale mit DAPI positiven Mikroorganismen, von denen einige mit der bakteriellen FISH-Sonde detektiert werden konnten. Allerdings waren die kokkoiden Stäbchen mit keiner der anderen genus-spezifischen Sonden für Streptokokken, Staphylokokken oder Enterokokken nachweisbar. Daher wurde aus den Schnitten DNA extrahiert. Die nachfolgende 16S rRNA-Gen PCR und Sequenzierung ergab ein 314 Basen langes Fragment mit höchster Homologie (99,7% Identität) zu *Bartonella quintana*. Dieser Befund war bei dem Patienten überraschend, weil er keine der bekannten Risikofaktoren für eine Infektion mit *B. quintana*, wie Alkoholismus, Lausbefall, Obdachlosigkeit beziehungsweise Immunsuppression hatte.

Bartonella quintana wird wegen ihrer anspruchsvollen Kulturbedingungen häufig nicht diagnostiziert. Der serologische Nachweis einer *Bartonella* Infektion ist schwierig, da die Ergebnisse oft nicht eindeutig sind und das Risiko einer Kreuzreaktion mit anderen *Bartonella* Spezies oder *Chlamydien* tragen. Einige Studien lassen eine hohe Zahl falsch oder nicht diagnostizierter Fälle vermuten (61, 76, 122). Kommerzielle NAT zum Nachweis von *Bartonella* sind derzeit nicht erhältlich.

FISH zum Nachweis von *B. quintana*: Um die in den Schnitten der Herzklappen detektierten Mikroorganismen eindeutig als *B. quintana* identifizieren zu können, wurde eine spezies-spezifische Oligonukleotidsonde entwickelt. Die Spezifität und Sensitivität

der Cy3-markierten FISH-Sonde wurde mit einem *B. quintana* Referenzstamm (Collection de l'Institut Pasteur 103739) als Positivkontrolle und *Bartonella bacilliformis* (ATCC 35686) mit 2 Fehlpaarungen sowie *B. henselae* (ATCC 49882) mit 3 Fehlpaarungen als Negativkontrollen evaluiert. Bei stringenten Hybridisierungsbedingungen mit 20% Formamid konnten die Bakterien in den Aortenklappenschnitten mittels FISH eindeutig als *B. quintana* identifiziert werden. Darüber hinaus war eine Vielzahl von DAPI-positiven Bakterien sichtbar, welche sich weder mit der Bartonella spezifischen Sonde BAQU noch mit der bakteriellen Sonde EUB338 darstellen ließen. Hierbei handelte es sich um vermutlich nicht mehr vitale *B. quintana* Zellen, deren rRNA Gehalt sich unter der Nachweisgrenze der FISH befand. Dagegen sprach das intensive Fluoreszenzsignal der FISH-positiven Zellen für eine metabolische Aktivität der entsprechenden Bakterien zum Zeitpunkt der Operation.

FISH erlaubte somit die schnelle und eindeutige *in situ* Identifikation von *B. quintana* als Erreger der infektiösen Endokarditis und gab darüber hinaus einen Hinweis auf Vitalität der Bakterien im Vorfeld der Operation.



A view on *Bartonella quintana* endocarditis—confirming the molecular diagnosis by specific fluorescence in situ hybridization[☆]

Dorothee Maria Gescher^a, Christian Mallmann^a, Dragoljub Kovacevic^a, Dinah Schmiedel^a, Adrian C. Borges^b, Birgitta Schweickert^a, Ulf B. Göbel^a, Annette Moter^{a,*}

^aInstitut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité-Universitätsmedizin Berlin, D-10117 Berlin, Germany

^bMedizinische Klinik, Charité-Universitätsmedizin Berlin, D-10117 Berlin, Germany

Received 1 March 2007; accepted 20 July 2007

Abstract

Culture-negative endocarditis is a frequent problem in cardiology, especially if caused by fastidious organisms. Among these, the diagnostic tools for the detection of *Bartonella quintana* are still unsatisfactory. In a culture-negative case of suspected endocarditis undergoing aortic valve replacement, polymerase chain reaction amplification and sequencing of the 16S rRNA gene indicated *B. quintana* infection. To develop a new diagnostic tool, independent from culture and amplification techniques, we designed and optimized an oligonucleotide fluorescence in situ hybridization (FISH) probe specific for *B. quintana* and suitable for FISH. FISH succeeded in simultaneous visualization and identification of vital microorganisms directly within the aortic valve tissue and in fast and univocal diagnosis of *B. quintana* endocarditis.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Endocarditis; In situ hybridization; *Bartonella* infection; Molecular diagnostic techniques

Copyright
beim
Verlag

[☆] This study has been supported by the Sonnenfeld-Stiftung, Berlin, Germany, and by a grant from European Structural Funds (EFRE) in the ProFIT program scheme, grant No. 10134986.

* Corresponding author. Tel.: +49-30-450-524226; fax: +40-30-450-524902.

E-mail address: annette.moter@charite.de (A. Moter).

2.2.2.2. Zusammenfassung

Die kulturnegative Endokarditis ist ein häufiges Problem in der Kardiologie, insbesondere wenn schwer kultivierbare Mikroorganismen beteiligt sind. So sind zum Beispiel die diagnostischen Nachweisverfahren für *Bartonella quintana* bislang unbefriedigend. In einem Fall von vermuteter kulturnegativer infektiöser Endokarditis wurde bei einem Patienten ein Aortenklappenersatz durchgeführt. Da das Herzklappenmaterial ebenfalls kulturnegativ blieb, wurde eine PCR Amplifikation mit nachfolgender Sequenzierung durchgeführt, welche auf eine *B. quintana* Infektion hinwies. Für den *in situ* Nachweis dieser schwer kultivierbaren Erreger im Gewebe wurde eine spezies-spezifische FISH-Sonde entwickelt. FISH erlaubte den schnellen, direkten Nachweis von vitalen *B. quintana* Zellen im histologischen Gewebsschnitt und war somit eindeutig beweisend für eine *B. quintana* Endokarditis.

2.2.2.3. Ausblick

In gleicher Weise konnten wir *Tropheryma whipplei* mit der spezifischen Sonde RE-Whip 3, welche wie unter 2.1. beschrieben optimiert worden war, in Schnitten von Herzklappen nachweisen (Abb. 4).



Abb. 4: Nachweis von *T. whipplei* in einer Herzklappe. Abb. 4A: In der Übersicht sind ausgedehnte Verkalkungen sichtbar (Pfeil). Abb. 4B: Bei höherer Auflösung werden einzelne *T. whipplei* Organismen durch die spezifische Sonde RE-Whip 3 nachgewiesen (orange).

Für eine erfolglose Anzucht der Erreger bei Endokarditis kann aber auch die bei Probennahme bereits begonnene Antibiotikatherapie verantwortlich sein. Mittlerweile konnten wir an kulturnegativen Herzklappen von Endokarditispatienten mittels FISH die Endokarditis bestätigen und genus- oder spezies-spezifischen Sonden die Pathogene identifizieren. Hierbei hat sich das für die Sepsisdiagnostik optimierte Sondenpanel bewährt (Abb. 5 – 8). Die Verteilung der Bakterien im Gewebe reichte von einzelnen Mikroorganismen (Abb. 5) über Mikrokolonien (Abb. 6) bis hin zu ausgeprägten

bakterielle Biofilmen (Abb. 7). Die Verwendung von FISH in Kombination mit dem unspezifischen Nukleinsäurefarbstoff DAPI ließ eine räumlich organisierte Biofilmanordnung mit Zonen ribosomenhaltiger, FISH-positiver Schichten und metabolisch inaktiven bzw. toten Zonen erkennen (Abb. 7).



Abb. 5: Visualisierung von *Streptococcus oralis* in einer Herzklappe bei kulturnegativer Endokarditis. Abb. 5A: Übersicht, Abb. 5B: Bei höherer Auflösung werden einzelne Bakterien mit der Cy3 markierten *Streptococcus*-spezifischen Sonde STREP1 als kurze Ketten oder Zellcluster sichtbar (orange).



Abb. 6: Herzklappe mit Besiedlung durch *S. aureus*. Abb. 6A: In der Übersicht sind ausgedehnte Felder mit Bakterien, sowie kleine Mikrokolonien (Pfeile) sichtbar. Abb. 6B: Bei höherer Auflösung zeigen sich zahlreiche DAPI-positive Kokken (blau), von denen ein Teil mit der *S. aureus*-spezifischen FISH-Sonde (orange) detektiert wird.

geschützt

Abb. 7A: Strukturierter *Enterococcus faecalis* Biofilm auf einer Aortenklappe. Abb. 7B: Während die äußeren Schichten nur mit dem unspezifischen Nukleinsäurefarbstoff DAPI gefärbt werden (blau) sind die inneren Schichten durch die *E. faecalis* spezifische Sonde EFAEC visualisiert (orange).

So könnte diese Technik in Zukunft nicht nur einen wertvollen Beitrag zur Endokarditisdiagnostik leisten und den Nachweis schwer kultivierbarer Mikroorganismen, wie z. B. *Tropheryma whipplei*, erlauben, sondern auch Aufschluss über die Biofilmorganisation *in vivo* gewachsener Biofilme geben.

2.2.3. FISH zum *in situ* Erregernachweis langsam wachsender Spezies am Beispiel der Mykobakterien Diagnostik

Infektionen durch Mykobakterien verlaufen in der Regel chronisch und unbehandelt häufig letal. Tuberkulose ist weiterhin ein globales Problem mit derzeit immer noch beträchtlicher Inzidenz und Mortalität. Die World Health Organization (WHO) schätzt die Zahl der Neuerkrankungen auf weltweit 9,3 Millionen im Jahr 2008, 1,3 Millionen Patienten starben an TB in diesem Jahr (Fact Sheet No 104, März 2010, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>,). In Deutschland ist die Zahl der Neuerkrankungen seit Jahren kontinuierlich rückläufig und lag 2008 bei einer Inzidenz von 5,5 pro 100.000 Einwohnern (Robert Koch Institut (95)). Allerdings hat die Diagnose einer Tuberkulose weitreichende Konsequenzen für das Patientenmanagement. Sie bedeutet für den Patienten eine belastende Kombinationstherapie mit Antituberkulotika über Monate sowie Isolierung und hygienische Maßnahmen zur Infektionsprophylaxe und Meldung an das Gesundheitsamt. Auch die Differenzierung von sogenannten ‚atypischen‘, nichttuberkulösen (englisch MOTT; mycobacteria other than tuberculosis) Mykobakterien hat im letzten Jahrzehnt an Bedeutung gewonnen, weil durch die wachsende Zahl immunsupprimierter Patienten Infektionen durch diese Erreger häufiger geworden sind. Die schnelle und sichere Abgrenzung von MOTT gegenüber dem *M. tuberculosis* Komplex (MTBC) ist aus therapeutischen und infektionsprophylaktischen Gründen wünschenswert. Da Mykobakterien äußerst langsam wachsen und metabolisch wenig aktiv sind, ist sowohl ihre Anzucht als auch die biochemische Differenzierung langwierig und aufwendig. Hier haben die molekularbiologischen Methoden entscheidend an Bedeutung gewonnen. Spezifische NAT für den Nachweis von MTB-Komplex und auch PCR mit nachfolgender Sequenzierung des 16S rRNA-Gens finden mittlerweile routinemäßig Anwendung. Während es für den Nachweis von MTBC etablierte und routinefähige, kommerzielle Systeme gibt, ist die schnelle und kostengünstige Differenzierung der MOTT bisher allerdings immer noch personell, technisch und räumlich gut ausgestatteten Laboren vorbehalten. Weitere Verfahren, die zur Mykobakteriendifferenzierung erfolgreich eingesetzt wurden, sind zum Beispiel Spoligotyping (52, 14) zum Nachweis epidemiologischer Zusammenhänge, MALDI-TOF zur schnellen Speziesidentifizierung (66, 91) oder auch eine Kombination dieser beiden Techniken (50).

Der Erreger der Lepra, *Mycobacterium leprae*, ist bis heute noch nicht *in vitro* kultiviert worden und kommerzielle spezifische Nachweismethoden sind nicht erhältlich. Daher ist nach wie vor der mikroskopische Nachweis säurefester Stäbchen ein wichtiges

Instrument und häufig der erste greifbare Hinweis auf eine Mykobakterieninfektion, welcher jedoch keine Speziesidentifikation erlaubt.

FISH stellt hier eine schnelle und günstige Alternative dar. Dies gilt auch für Laboratorien, die nicht über eine molekularbiologische Einheit verfügen, denn die apparative Ausrüstung welche für die FISH benötigt wird ist vergleichsweise moderat; ein Hybridisierungssofen und ein Fluoreszenzmikroskop, welches in den Laboratorien, welche Acridinorangefärbung benutzen ohnehin vorhanden ist. Allerdings sind den Fluorochromen entsprechende Schmalband-Fluoreszenzfilter wünschenswert. Ein weiterer Vorteil der FISH ist, dass mikrobiologisch geschultes Laborpersonal Erfahrung in der Mikroskopie von Mikroorganismen und klinischen Materialien hat, was gerade für die Mykobakteriendiagnostik von großem Wert ist.

Allerdings penetrieren die üblicherweise für die FISH benutzten Oligonukleotidsonden die mykolsäurehaltige Zellwand der Mykobakterien nur sehr schlecht oder gar nicht. Auch enzymatische Behandlungen wie sie für die FISH von Gram-positiven Bakterien benutzt werden, waren bei Mykobakterien nicht erfolgreich. Hier finden PNA (peptide nucleic acid)-Sonden Anwendung, welche wegen ihres ungeladenen Peptid-Rückrats ungehindert in Mykobakterien eindringen können (101, 102, 49). In der vorliegenden Arbeit wurden vier spezifische PNA-Sonden für die FISH entwickelt, optimiert und für die Anwendung an Kulturen sowie an klinischem Material evaluiert.

Entwicklung von PNA Sonden für die Mykobakteriendiagnostik

Spezifische SONDENSEQUENZEN wurden mit Hilfe der ARB Software (<http://www.arb-home.de>) ausgewählt. Die neu entwickelten Sonden hatten eine für PNA-Sonden typische Länge von nur 15 Basenpaaren (Bp), was die Auswahl an spezifischen Bindungsstellen in der 16S rRNA erschwert. Auf Vermeidung von Primer-Dimer und Haarnadelstrukturen, sowie ein ausgewogenes Verhältnis von Purinen zu Pyrimidinen wurde geachtet. Wie bei dem Design von Oligonukleotidsonden wurden auch die PNA-Sonden mit allen Sequenzen, die derzeit (Juni 2006) in den Datenbanken von EMBL und GenBank erhältlich waren, abgeglichen. Die Sonden haben eine spezifische Nukleinsäuresequenz für *M. tuberculosis* Komplex (MTBC), *M. kansasii* und *M. gastrii*, welche im Bereich der 16S rRNA 100% homolog sind, *M. avium* Komplex, *M. intracellulare* und *M. leprae*. Zur Optimierung stringenter Hybridisierungsbedingungen wurden die mit den Fluorochromen TAMRA bzw. Cy3 markierten Sonden auf Ausstrichen von fixierten Mykobakterien-Flüssigkulturen ausgetestet. Die entsprechenden Zielspezies (außer dem nicht kultivierbaren *M. leprae*) dienten als Positivkontrolle, während Stämme mit einer Fehlpaarung im Sondenbindungsereich als Negativkontrollen benutzt wurden. Es zeigt sich, dass eine einzige Fehlpaarung

ausreichend ist, um bei der PNA-FISH zwischen Spezies zu unterscheiden. Allein bei der *M. intracellulare*-spezifischen Sonde war es auch nach ausgiebiger Optimierung der Hybridisierungsbedingungen nicht möglich, eine erfolgreiche und spezifische FISH zu etablieren.

In Folge wurden die Sonden unter optimierten Hybridisierungsbedingungen gegen ein Panel von 25 Mykobakterien- und 10 weitere Gram-positive Spezies getestet und die Spezifität der Hybridisierung bestätigt.

Anwendung der PNA-FISH in der Mykobakteriendiagnostik

Um die Anwendung der FISH für die Identifikation von Mykobakterienkulturen in der klinischen Routinediagnostik zu untersuchen, wurden 52 konsekutive Patientenisolat fixiert und mit der PNA-FISH untersucht. Alle 24 MTBC Fälle, sieben *M. avium* Isolate und ein *M. kansasii* Stamm wurden korrekt durch die entsprechenden PNA-Sonden identifiziert.

Für die Optimierung der PNA-FISH für den Nachweis von Mykobakterien an und in eukaryonten Zellen, wurde eine mit *Mycobacterium bovis* BCG infizierte Zellkultur von adhären humanen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) getestet. Einzelne Mykobakterien ließen sich deutlich fluoreszierend von dem leicht autofluoreszierenden Hintergrund der APC abgrenzen. Ebenfalls erfolgreich war die Hybridisierung von histologischen Schnitten. Im Lungengewebe von Mäusen, welche mit dem Laborstamm *M. tuberculosis* H37Rv experimentell infiziert worden waren, konnte mit Hilfe der PNA-FISH ebenso eindeutig MTBC nachgewiesen werden, wie in einer Lungenbiopsie eines Tuberkulosepatienten. Auch die spezifische Sonde für *M. avium* bewährte sich in der PNA-FISH am histologischen Schnitt. In einem Fall von Paratuberkulose beim Rind (englisch Johne's disease), konnte *M. avium* subsp. *paratuberculosis* im Gewebe visualisiert werden. Schließlich konnte auch *M. leprae* in einer Hautbiopsie eines Leprapatienten eindeutig nachgewiesen werden.

Insbesondere durch die Möglichkeit, Mykobakterien direkt im histologischen Schnitt zu detektieren und zu identifizieren, kann die PNA-FISH wertvolle Informationen zur Pathogenese von Mykobakteriosen liefern. Das gilt zum einen für experimentelle Untersuchungen wie Infektionsversuche, zum anderen für klinisches Material.

Durch das veränderte Patientenkollektiv im letzten Jahrzehnt und dadurch breitere Erregerspektrum der Mykobakteriosen hat sich auch das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung geändert. Häufig wird erst durch die histologische Untersuchung von Biopsien oder Operationsmaterial bei chirurgischer Entfernung von Tumoren der Verdacht auf eine Mykobakterieninfektion geäußert. Dieses Material ist für die kulturelle Anzucht von Mikroorganismen untauglich. Auch für NAT Verfahren ist

Paraffin eingebettetes Gewebe problematisch, da die DNA-Extraktion nicht optimal durchgeführt werden kann und die DNA Fragmente häufig zu kurz für eine Konsensus-PCR mit nachfolgender Sequenzierung sind. In solchen Fällen kann die PNA-FISH für die Diagnose herangezogen werden. Ein weiterer Vorteil des *in situ* Nachweises ist die Darstellung der Mikroorganismen im histologischen Kontext, der zweifelsfrei eine Infektion belegt, während NAT Verfahren kontaminationsanfällig sind. Die rRNA ist in fixiertem und eingebettetem Material so stabil, dass sechs Jahre alte Schnitte noch eindeutig positive Ergebnisse zeigten.

Die PNA-FISH erwies sich somit als vielseitige und zuverlässige Methode für den Nachweis von Mykobakterien bei diagnostischen und experimentellen Anwendungen in der Mikrobiologie oder Pathologie.

Evaluation of Peptide Nucleic Acid-Fluorescence In Situ Hybridization for Identification of Clinically Relevant Mycobacteria in Clinical Specimens and Tissue Sections

Michael Lefmann,^{1†} Birgitta Schweickert,¹ Petra Buchholz,¹ Ulf B. Göbel,¹ Timo Ulrichs,^{2‡} Peter Seiler,^{2§} Dirk Theegarten,^{3¶} and Annette Moter^{1*}

Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Dorotheenstrasse 96, 10117 Berlin, Germany¹; Abteilung für Immunologie, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Schumannstrasse 21/22, 10117 Berlin, Germany²; and Abteilung für Pathologie, Ruhr-Universität Bochum, Universitätsstrasse 150, 44780 Bochum, Germany³

Received 11 July 2006/Accepted 5 August 2006

With fluorescently labeled PNA (peptide nucleic acid) probes targeting 16S rRNA, we established a 3-h fluorescence in situ hybridization (FISH) procedure for specific visualization of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. leprae*, *M. avium*, and *M. kansasii*. Probe specificity was tested against a panel of 25 *Mycobacterium* spp. and 10 gram-positive organisms. After validation, probes were used to identify 52 mycobacterial culture isolates. Results were compared to conventional genotypic identification with amplification-based methods. All isolates (*M. tuberculosis* complex, *n* = 24; *M. avium*, *n* = 7; *M. kansasii*, *n* = 1) were correctly identified by FISH. In addition, the technique was used successfully for visualization of mycobacteria in biopsies from infected humans or animals. In conclusion, PNA-FISH is a fast and accurate tool for species-specific identification of culture-grown mycobacteria and for direct visualization of these organisms in tissue sections. It may be used successfully for both research and clinical microbiology.

Mycobacterial infections are associated with chronic disease, often with a fatal outcome. Tuberculosis is a growing global public health problem, with an estimated 8 million new cases and about 2 million deaths each year (23). According to the WHO website on leprosy (<http://www.who.int/lep/>), 407,791 new cases of leprosy were detected during 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. kansasii* are important pathogens causing severe disease in immunocompromised patients (1), and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease in ruminants, is responsible for significant economic losses in the livestock industry worldwide (22).

Detection of mycobacteria in clinical specimens by conventional methods is difficult because of the low numbers of bacilli available, their slow growth, and their fastidious metabolism. Cultivation of *M. leprae* is still impossible. Recently, conventional methods such as acid-fast staining, culture, and phenotypic differentiation have been complemented by nucleic acid probes and amplification-based methods, substantially reducing the time to diagnosis (11).

Specific visualization of mycobacteria, e.g., by fluorescence in situ hybridization (FISH), would be a great help in directly identifying bacteria in clinical and environmental samples (11,

12). However, conventional oligonucleotide probes barely penetrate bacteria with cell walls containing mycolic acids. The relative hydrophobic character of PNA (peptide nucleic acid) probes compared to DNA analogues allows better diffusion through the hydrophobic cell wall of mycobacteria (19, 20). However, the FISH assays available so far are restricted to differentiation of tuberculous from nontuberculous *Mycobacterium* species in acid-fast bacillus-positive sputum smears or in culture (2, 6, 15, 21), as well as *M. avium* in potable-water biofilms (9).

There are several reports describing the detection of *M. tuberculosis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue sections by staining with antibodies or in situ hybridization (ISH). Seiler and colleagues (18) used a polyclonal anti-*M. bovis* Bacille Calmette-Guerin serum for detection of cell wall-deficient *M. tuberculosis* in mouse tissue. Naser and colleagues (13) demonstrated *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue specimens from patients with Crohn's disease with a polyclonal antibody. Several authors have described the detection of mycobacterial DNA or RNA in tissue specimens of human or animal origin with ISH or in situ PCR techniques (3, 4, 5, 7, 8, 17). One paper reported on ISH with PNA probes, followed by signal amplification, to differentiate between *M. tuberculosis* complex and nontuberculous *Mycobacterium* spp. in archival biopsy and autopsy samples (24). All of the methods described so far either lack specificity (antibody-based staining), are laborious and time consuming, or do not distinguish single mycobacteria. Bacteria are not resolved properly but appear as a stained mass of uncertain identity.

Here we present an improved method using fluorescently labeled PNA probes for fast visualization and identification of members of the *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. kansasii*, and *M. leprae* in smears and tissue biopsies. A rapid (3-h) FISH

* Corresponding author. Mailing address: Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Dorotheenstr. 96, 10117 Berlin, Germany. Phone: 49-30-450-524226. Fax: 49-30-450-524902. E-mail: annette.moter@charite.de.

† Present address: HAEMA AG, Institut für Medizinische Mikrobiologie am HELIOS-Klinikum Berlin-Buch, 13125 Berlin, Germany.

‡ Present address: German Federal Ministry of Health, 10117 Berlin, Germany.

§ Present address: Actelion Pharmaceuticals Ltd., CH-4123 Allschwil, Switzerland.

¶ Present address: Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen, D-45122 Essen, Germany.

TABLE 1. PNA probe sequences and hybridization conditions^a

Probe (concn [μ M])	Sequence (orientation)	Target species or control	Hybridization and washing temp ($^{\circ}$ C)	% Formamide (vol/vol)
MTBC _{Cy3} (1.0)	TCC TGG TGC CCT ACG-Cy3 (3'-5') AGG ACC ACG GGA TGC (5'-3') AGG ACC ACG GGA TTC (5'-3') AGG ACC ACG GCA TGC (5'-3') AGG ACC ATG GGA TGC (5'-3')	MTBC _{Cy3} <i>M. tuberculosis</i> complex <i>M. marinum</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. celatum</i>	60	50
MAV _{TAMRA} (1.5)	CTG GAG TTC TGC GTA-TAMRA (3'-5') GAC CTC AAG ACG CAT (5'-3') GAC CTC AAG GCG CAT (5'-3')	MAV _{TAMRA} <i>M. avium</i> <i>M. haemophilum</i>	55	30
MKA _{TAMRA} (1.5)	GAC GTG TGG CCC TAT-TAMRA (3'-5') CTG CAC ACC GGG ATA (5'-3') CTG CAC ACT GGG ATA (5'-3') CTG CAC ATC GGG ATA (5'-3')	MKA _{TAMRA} <i>M. kansasii</i> <i>M. intermedium</i> <i>M. goodnae</i>	55	40
MLEP _{TAMRA} (1.5)	ATC CTG AAG TTC CGC-TAMRA (3'-5') TAG GAC TTC AAG GCG (5'-3') TAG GAC CTC AAG GCG (5'-3')	MLEP _{TAMRA} <i>M. leprae</i> <i>M. haemophilum</i>	55	30

^a The probe concentrations, hybridization temperatures, and formamide concentrations in the hybridization buffer shown are the optimal hybridization conditions for FISH experiments.

procedure was established and evaluated by using mycobacteria cultured from clinical specimens. *M. tuberculosis* complex-, *M. leprae*-, and *M. avium*-specific PNA probes were used successfully for specific visualization of the respective mycobacteria in tissue sections from infected humans or animals. This technical improvement may have a great impact on the detection of mycobacteria in research or diagnostic laboratories particularly in those which are unable or unwilling to invest into a highly sophisticated molecular genetic facility.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and liquid cultures of clinical specimens. *Mycobacterium* sp. reference strains ($n = 17$) and mycobacterial isolates ($n = 9$) from our clinical microbiology laboratory (see Table 2), as well as 10 gram-positive organisms (*Actinomyces israelii* [clinical isolate], *Actinomyces odontolyticus* [ATCC 17929], *Corynebacterium matruchotii* [DSM20635], *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* [clinical isolate], *Enterococcus faecalis* [ATCC 29121], *Erysipelothrix rhusiopathiae* [clinical isolate], *Lactobacillus paracasei* [clinical isolate], *Nocardia brasiliensis* [clinical isolate], *Staphylococcus aureus* [ATCC 25923], and *Staphylococcus epidermidis* [ATCC 12228]) were used to validate the FISH procedure. The species identities of all strains or isolates were confirmed by 16S rRNA gene PCR and sequencing. The FISH assay was validated by using 52 liquid cultures positive for acid-fast bacilli from a variety of clinical specimens. PNA-FISH was compared to standard molecular genetic identification methods based upon nucleic acid amplification (Roche COBAS Amplicor for members of the *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* and sequencing of 16S rRNA genes for other species). All mycobacteria were grown in liquid medium (MGIT liquid medium; Becton Dickinson Europe, France) with an enrichment supplement (MGIT system oleic acid-albumin-dextrose-citric acid) and an antimicrobial supplement (MGIT system PANTA [polymyxin B, nalidixic acid, trimethoprim, and azlocillin]) at 37°C or 30°C for *Mycobacterium* spp. and *M. marinum*, respectively.

Fixation of bacteria. Bacteria from a positive MGIT vial were concentrated by centrifugation (3,300 \times g, 20 min), washed once with 1 ml phosphate-buffered saline (pH 7.4, 3,300 \times g, 20 min). Fixation solution (100 to 500 μ l depending on pellet size) consisting of 3.7% (vol/vol) formaldehyde in 50% ethanol in phosphate-buffered saline (pH 7.4) was added. The pellet was dissolved and stored at -20°C for a minimum of 15 min. Fixation efficiency was examined by subculturing complete pellets of fixed *M. tuberculosis* and *M. fortuitum* cells. Fixed mycobacteria were resuspended in MGIT liquid medium (800 μ l) with enrichment supplement and streaked onto Lowenstein-Jensen and Stonebrink slants (100 μ l each). After an incubation period of 8 weeks at 37°C, no growth was recorded on either liquid or solid culture medium.

Mycobacteria in cells and in tissue sections. Adherent human antigen-presenting cells (APC) grown on microscope slides were infected with *M. bovis* BCG and fixed in 4% (vol/vol) paraformaldehyde for PNA-FISH. Sections (4 to 5 μ m) of paraffin-embedded tissue from skin biopsy samples from a patient with leprosy, from lungs of *M. tuberculosis*-infected C57BL/6 mice (18), or from animals with Johne's disease were deparaffinized by immersion in xylol 100% (vol/vol, 10 min) and ethanol 100% (vol/vol, 5 min) three times. Lung tissue from one patient with culture-proven tuberculosis was embedded in cold polymerizing resin (Echnovit 8100; Kulzer, Germany) as described by Moter and Göbel (11) and sectioned (3- to 4- μ m thickness).

PNA probes. Probes MTBC_{Cy3}, MLEP_{TAMRA}, MAV_{TAMRA}, and MKA_{TAMRA} were designed for specific detection of members of the *M. tuberculosis* complex, *M. leprae*, *M. avium*, and *M. kansasii* 16S rRNA, respectively, with the 16S rRNA sequence database and the probe design program of the ARB software (<http://www.arb-home.de/>). Probes were chosen with regard to purine content and secondary structure, avoiding hairpin formations and inverse repeats. To assess their specificity, all probe sequences were compared to all of the 16S rRNA entries in the EMBL and GenBank databases currently (June 2006) accessible by using the programs BLASTN and FASTA of the HUSAR (version 4.0; Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources) program package (DKFZ, Heidelberg, Germany). The PNA probe BacUni-1_{Fluo} (fluorescein), complementary to a region of the 16S rRNA gene conserved in the domain *Bacteria* (eubacterial probe), was used as a positive control (BacUni-1_{Fluo} [5'-CTG CCT CCC GTA GGA-3']) (14, 16). MTBC_{Cy3}, MLEP_{TAMRA}, and BacUni-1_{Fluo} were purchased from Applied Biosystems (Foster City, Calif.), and MAV_{TAMRA} and MKA_{TAMRA} were synthesized by TIB MOLBIOL (Berlin, Germany).

ISH. Culture-grown and fixed bacteria (2 to 5 μ l) were spotted onto six-field microscope slides (Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim, Germany), air dried, dehydrated in 100% (vol/vol) methanol for 1 min and 100% (vol/vol) ethanol for 5 min, air dried again, and preheated to hybridization temperature. Slides with APC and tissue sections were preheated to hybridization temperature. Aliquots (10 μ l for cultured bacteria and 20 to 60 μ l for APC and tissue sections) of a hybridization mixture containing 10% (wt/vol) dextran sulfate (Merck, Darmstadt, Germany), 10 mM NaCl (Merck), 30 to 50% (vol/vol) formamide (Roth, Karlsruhe, Germany) (Table 1), 0.1% (wt/vol) sodium pyrophosphate (Merck), 0.2% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), 0.2% (wt/vol) Ficoll (Fluka Chemie AG, Basel, Switzerland), 5 mM disodium EDTA (Roth, Karlsruhe, Germany), 0.1% (vol/vol) Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Germany), 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), and a fluorescent probe(s) with a final concentration of 1 to 1.5 μ mol/liter (Table 1) were applied to each sample. Slides were incubated at a temperature optimized for each PNA probe (Table 1) in a preheated moisture chamber in the dark for 30 min. After brief immersion in double-distilled water, slides were washed in preheated washing buffer (5 mM Tris, 15 mM NaCl, 0.1% [vol/vol] Triton X-100 [pH 10; Serva]) at hybridization temperature for 10 min. Following a brief immersion in double-distilled water,

TABLE 2. Evaluation of PNA probe specificity

Organism	Source	MTBC _{Cy3} ^a		MAV _{TAMRA} ^b		MKA _{TAMRA} ^c		MLEP _{TAMRA} ^d		BacUni-1 _{Fluo} result ^e
		Result ^f	MM ^g	Result	MM	Result	MM	Result	MM	
<i>M. abscessus</i>	DSM 44196	n	4	n	6	n	2	n	7	+++
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	DSM 44156	n	4	+--+	0	n	2	n	2	++
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC 15769	n	4	+--+	0	n	2	n	2	++
<i>M. bovis</i>	Clinical isolate ^h	+--+	0	n	4	n	2	n	5	++
<i>M. celatum</i>	DSM 44243	n-(+)	1 (pos. 8)	n	5	n	2	n	7	++
<i>M. chubuense</i>	DSM 44219	n	1 (pos. 5)	n	5	n	3	n	5	++
<i>M. flavescens</i>	Clinical isolate	n	4	n	6	n	3	n	4	++
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	DSM 46621	n	4	n	6	n	2	n	8	++
<i>M. gordonae</i>	DSM 44160	n	3	n	3	n-(+)	1 (pos. 8)	n	5	++
<i>M. haemophilum</i>	DSM 44634	n	4	n-(+)	1 (pos. 6)	n	2	n-(+)	1 (pos. 9)	++
<i>M. interjectum</i>	DSM 44064	n	4	n	2	n	2	n	2	++
<i>M. intermedium</i>	DSM 44049	n	4	n	3	n-(+)	1 (pos. 7)	n	3	++
<i>M. intracellulare</i>	DSM 43223	n	4	n	3	n	2	n	3	++
<i>M. kansasii</i>	DSM 44162	n	4	n	4	+---	0	n	4	++
<i>M. marinum</i>	DSM 44344	n-(+)	1 (pos. 2)	n	5	n	2	n	7	++
<i>M. nonchromogenicum</i>	Clinical isolate	n	4	n	4	n	3	n	5	++
<i>M. phlei</i>	Clinical isolate	n	4	n	6	n	2	n	5	++
<i>M. scrofulaceum</i>	DSM 43992	n	4	n	4	n	2	n	4	++
<i>M. septicum</i>	Clinical isolate	n	4	n	6	n	3	n	4	++
<i>M. simiae</i>	Clinical isolate	n	4	n	4	n	2	n	4	(+)-++
<i>M. smegmatis</i>	DSM 43756	n	4	n	7	n	3	n	9	++
<i>M. terrae</i>	Clinical isolate	n-(+)	1 (pos. 8)	n	5	n	2	n	4	++
<i>M. triviale</i>	Clinical isolate	n	4	n	3	n	2	n	4	++
<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	+-----	0	n	4	n	2	n	5	++
<i>M. vaccae</i>	Clinical isolate	n	4	n	6	n	3	n	4	++
<i>M. xenopi</i>	DSM 43995	n-(+)	4	n	5	n	2	n	6	++

^a *M. tuberculosis* complex-specific PNA probe.^b *M. avium*-specific PNA probe.^c *M. kansasii*-specific PNA probe.^d *M. leprae*-specific probe.^e Eubacterial probe.^f n = negative. Fluorescence signal intensities: (+), slightly above background fluorescence; +, clearly visible; ++, strong; +++, very strong.^g MM, number of mismatches; pos., position from 5' end of probe.^h From a clinical specimen; identification by 16S rRNA gene sequencing.

slides were air dried and mounted with 1 drop of Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif.). Slides were incubated at hybridization temperature accordingly for 10 min.

Microscopy. Microscopy was performed with an epifluorescence microscope (Axioplan 2 imaging; Zeiss, Jena, Germany) equipped with a 100-W lamp (HBO 103; Osram) and 10×, 40×, and 100× objectives (Zeiss). Narrow-band HQ and F41-007 or F41-001 filter sets (AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany) were used to analyze fluorescein or Cy3 and 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) signals, respectively. Digital images were taken with an Axiocam HRC (Zeiss) and image acquisition was performed with Axiovision 4.0 software (Zeiss).

RESULTS

Probe design and evaluation. Probes of 15 bp each were designed for members of the *M. tuberculosis* complex (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, "*M. canetti*," *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, and *M. tuberculosis*), *M. avium* (*M. avium*, *M. paratuberculosis*, and *M. silvaticum*), and *M. leprae*. In addition, MTBC_{Cy3} and MAV_{TAMRA} showed a 100% match with sequences of *M. asiaticum* and *M. lepraemurium*, respectively. However, *M. asiaticum* has so far only rarely been isolated from patient specimens (10; www.ridom-rdna.de). *M. lepraemurium* causes endemic disease in rats and other animals and has not been identified from human sources yet (www.ridom-rdna.de). As *M. kansasii* and *M. gastri* share identical 16S rRNA sequences, a probe specific for both species was designed. Searches of publicly available databases with BLASTN and FASTA of the HUSAR sequence analysis package did not reveal any other bacterial 16S

rRNA gene sequences with a 100% match to MLEP_{TAMRA} and MKA_{TAMRA}.

For specificity control, we chose cultured *Mycobacterium* species with 16S rRNA sequences containing single base mismatches in the target region. Table 1 compiles probe sequences, complementary 16S rRNA sequences of target species and controls, and optimized hybridization conditions for sequence-specific FISH. *M. marinum* shows a single base mismatch at position 2 (from the 5' probe end) with probe MTBC_{Cy3}. To prevent unspecific hybridization of MTBC_{Cy3} to

TABLE 3. Identification by PNA-FISH of mycobacteria from 52 positive liquid cultures

Conventional identification	No. of isolates	PNA-FISH ^d result obtained with:		
		MTBC _{Cy3} ^a	MAV _{TAMRA} ^b	MKA _{TAMRA} ^c
<i>M. avium</i>	7	—	+++	—
<i>M. gordonae</i>	8	—	—	—
<i>M. intracellulare</i>	10	—	—	—
<i>M. kansasii</i>	1	—	—	+++
<i>M. marinum</i>	1	—	—	—
<i>M. tuberculosis</i>	24	+++	—	—
<i>M. xenopi</i>	1	—	—	—

^a *M. tuberculosis* complex-specific PNA probe.^b *M. avium*-specific PNA probe.^c *M. kansasii*-specific PNA probe.^d — = negative. For fluorescence signal intensity definitions, see Table 2, footnote f.

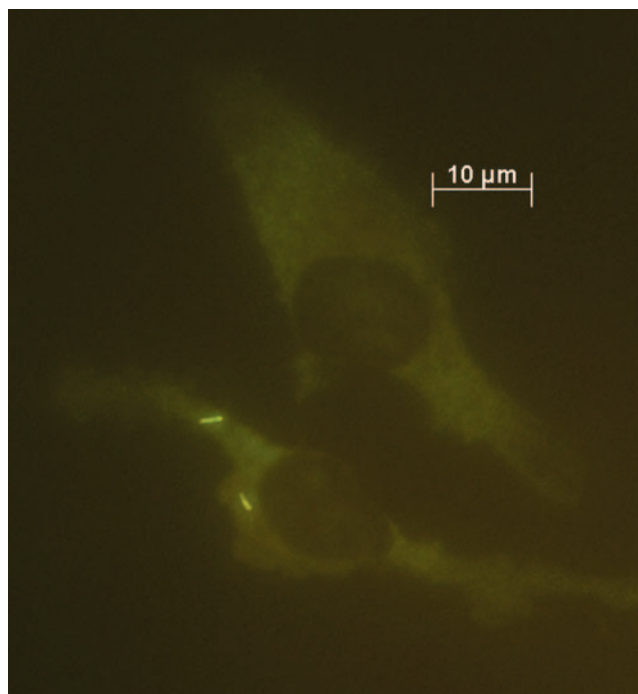


FIG. 1. Visualization by FISH (probe MTBC_{Cy3}) of human APC experimentally infected with *M. bovis* BCG.

M. marinum, high-stringency hybridization conditions (60°C, 50% formamide) were required. For *M. chubuense* and *M. celatum*, exhibiting single mismatches at positions 5 and 8 of the MTBC_{Cy3} probe sequence, less-stringent hybridization conditions (55°C, 40% formamide) were sufficient to prevent unspecific binding (data not shown). For probes MAV_{TAMRA} and MKA_{TAMRA}, exhibiting single base mismatches to *M. haemophilum* and *M. intermedium* or *M. goodnae*, respectively, unspecific binding was avoided by hybridization at 55°C and use of a formamide concentration of 30% or 40%, respectively. Since *M. leprae* has not yet been cultured, we used *M. haemophilum* (one mismatch at position 9) for evaluation of probe MLEP_{TAMRA}. Low-stringency hybridization conditions (50°C, no formamide) resulted in strong fluorescence signals in *M. haemophilum* and showed the applicability of the probe for FISH. Increasing the temperature to 55°C and the formamide concentration to 30% resulted in a weak fluorescence signal with *M. haemophilum*, indicating *M. leprae*-specific FISH. Hybridization with a PNA probe for specific visualization of *M. intracellulare* was not successful. The probe sequence chosen had single mismatches to many different mycobacterial species at positions 1 and 2 from the 5' probe end. We were not able to establish hybridization conditions avoiding unspecific binding (data not shown).

The specificity of all probes and hybridization conditions was evaluated with a panel of 25 different mycobacterial species (Table 2) and 10 different gram-positive organisms (see Materials and Methods). Species with single mismatches to the probe were included in every FISH experiment to control for unspecific binding. In FISH experiments lacking a PNA probe, fixed bacterial cells showed no or little autofluorescence (data not shown). Eubacterial probe BacUni-1_{Fluo} was used to check

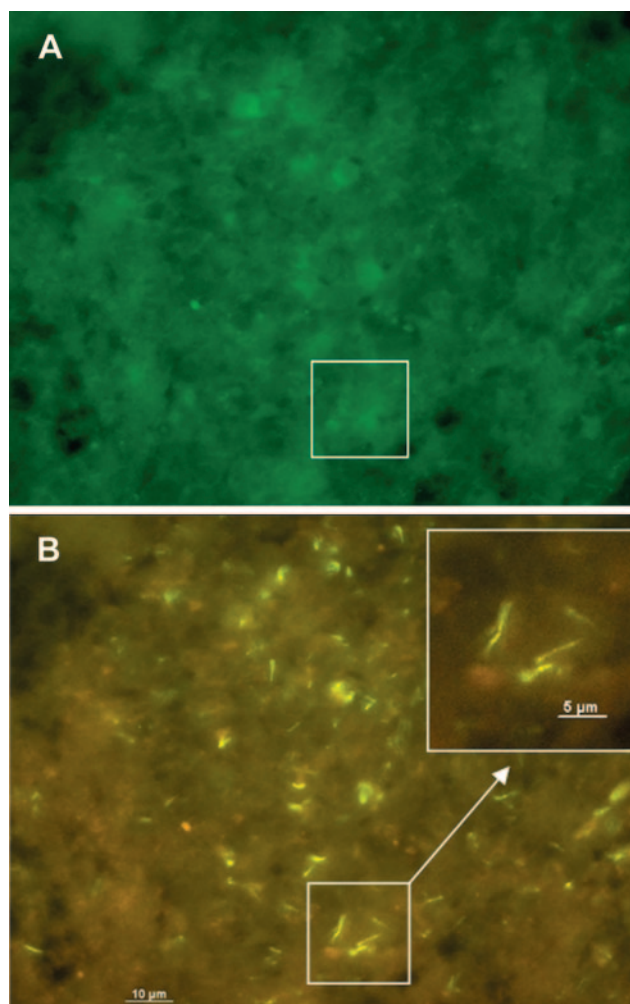


FIG. 2. Visualization by FISH (probe MTBC_{Cy3}) of *M. tuberculosis* H37Rv in a lung biopsy from an experimentally infected mouse. Same microscopic field visualized with a fluorescein filter set (A), showing background fluorescence allowing orientation within the tissue, and a Cy3-TAMRA filter set (B). The inset shows single mycobacterial cells.

for rRNA content, permeability of fixed bacteria, and a successful FISH procedure in positive and negative controls in every experiment. All fixed bacteria were stained by the eubacterial probe and visible as single cells or clusters. However, microscopy with the Cy3-TAMRA filter set (specific probes) revealed bright fluorescence of the target organisms only. No or weak signals were observed for mycobacterial species with single mismatches in the probe binding region. All other species showed no fluorescence with the specific probes.

Identification of mycobacteria cultured from clinical specimens. PNA-FISH results for mycobacteria cultured from patient materials are listed in Table 3. Mycobacterial isolates ($n = 52$) were fixed and hybridized with probes MTBC_{Cy3} and BacUni-1_{Fluo}. If the MTBC_{Cy3} FISH was negative, *M. avium*- and *M. kansasii*-specific probes combined with BacUni-1_{Fluo} were used. All FISH experiments were done in a blinded fashion, and results were compared to conventional identification after completion. FISH with probes MTBC_{Cy3}, MAV_{TAMRA}, and MKA_{TAMRA} resulted in the correct identification of all *M.*

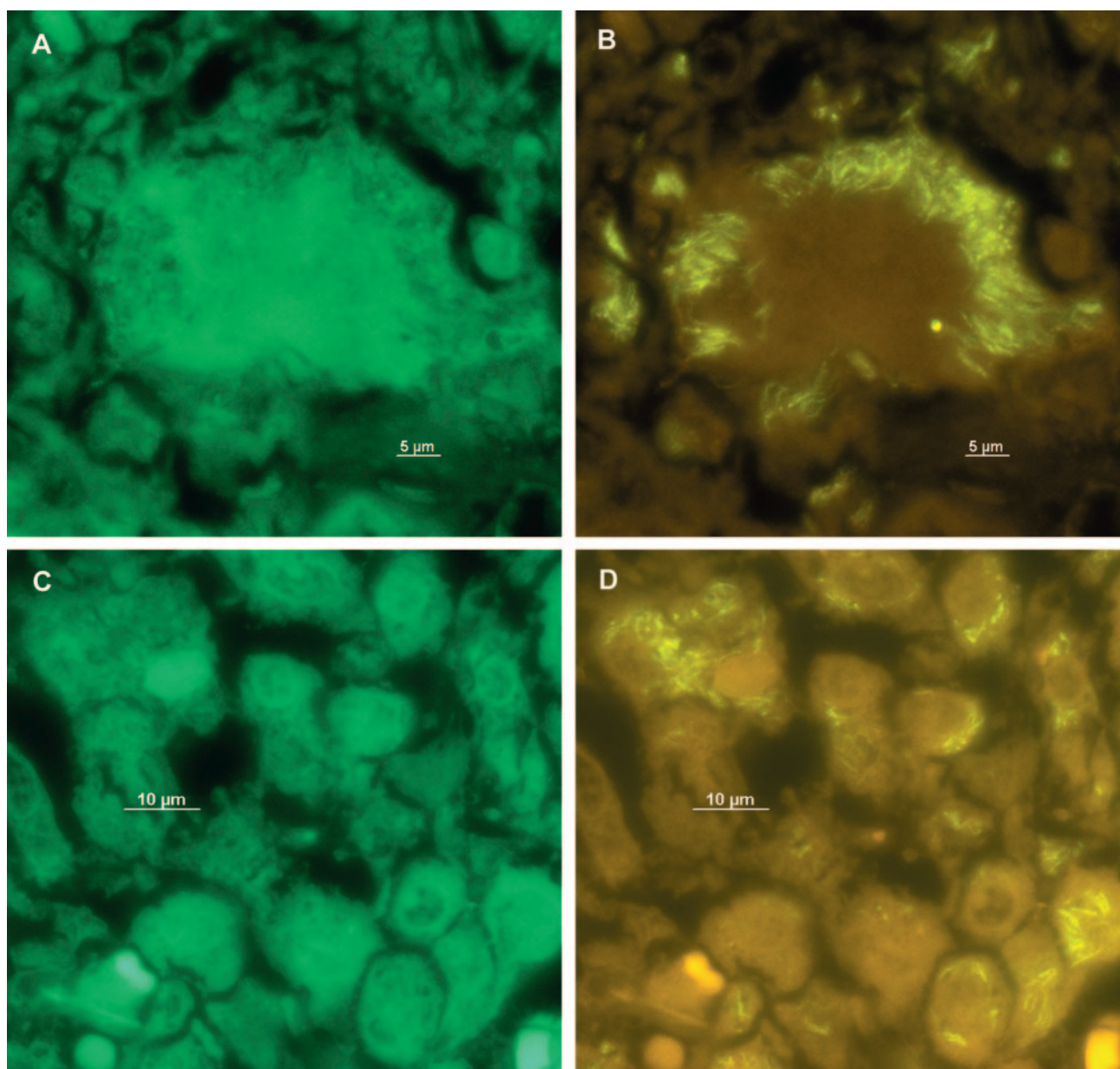


FIG. 3. Visualization by FISH (probe MTBC_{Cy3}) of *M. tuberculosis* in a lung biopsy from a tuberculosis patient. A and C, fluorescein filter set; B and D, Cy3-TAMRA filter set.

tuberculosis, *M. avium*, and *M. kansasii* isolates, respectively (Table 3).

Mycobacteria in cells and in tissue sections. After evaluation, PNA-FISH was used to visualize mycobacteria in fixed cells and tissue sections. Slides carrying *M. bovis* BCG-infected APC were hybridized with probe MTBC_{Cy3} (Fig. 1). *M. bovis* BCG showed a strong fluorescence on a weak background fluorescence of APC. Lung sections of mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv were examined with probe MTBC_{Cy3}, showing the spatial distribution of mycobacteria (Fig. 2B). Lung sections from a culture-proven case of human tuberculosis were stained with probe MTBC_{Cy3} as well. *M. tuberculosis* cells were found at the rim of the necrosis (Fig. 3A and B) and

inside macrophages (Fig. 3C and D). Probe MLEP_{TAMRA} was used for examination of a skin biopsy sample from a case of human leprosy, and single mycobacterial cells could be demonstrated (Fig. 4). Mycobacteria were demonstrated in corresponding tissue sections as single bacteria (Fig. 4A and B) or in groups (Fig. 4C and D). Furthermore, with MAV_{TAMRA}, *M. paratuberculosis* was visualized successfully in a case of ruminant Johne's disease (Fig. 5).

DISCUSSION

FISH detection of mycobacteria with oligonucleotide probes is difficult since probe penetration is hampered by long-chain

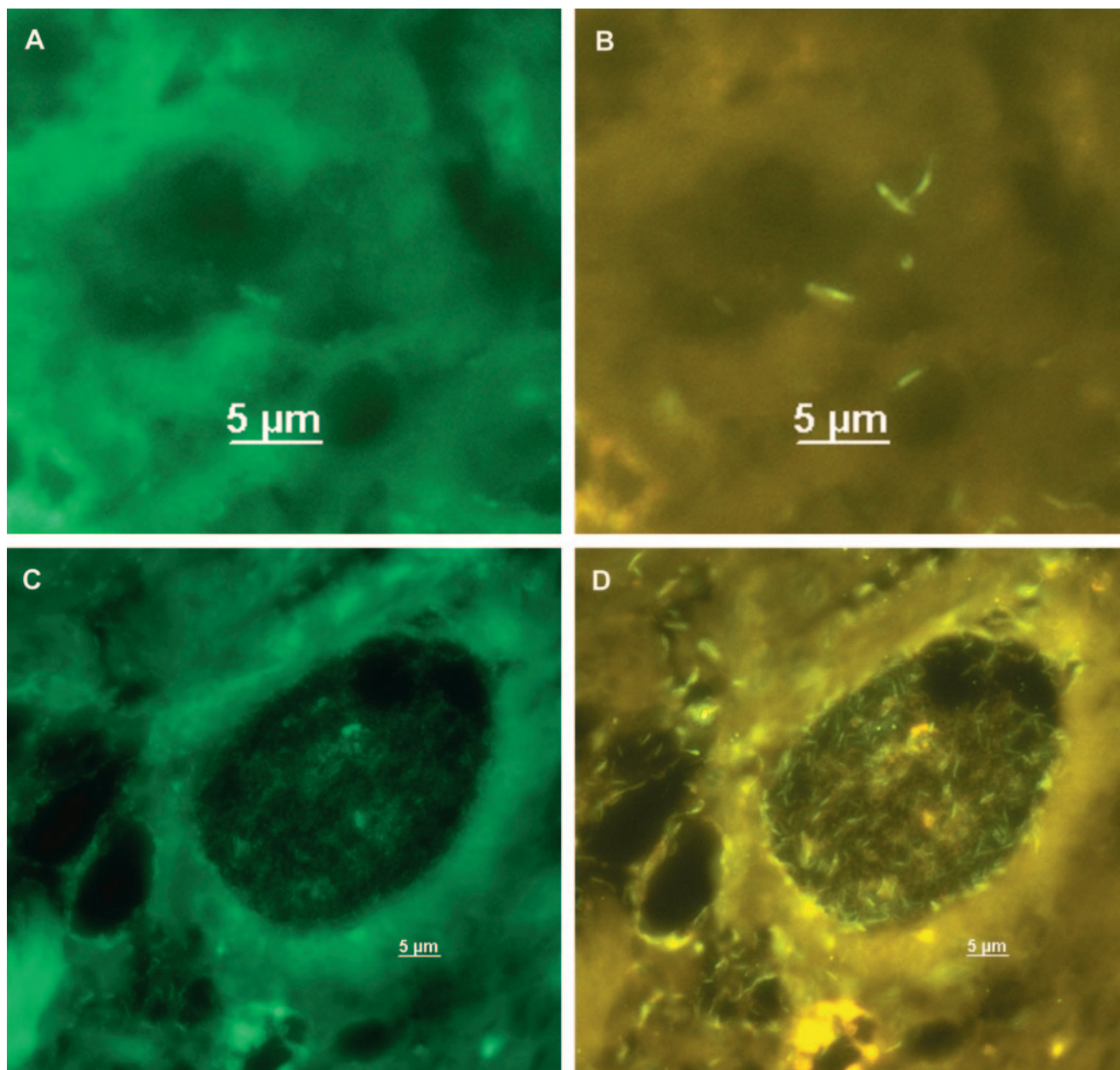


FIG. 4. FISH (probe MLEP_{TAMRA}) for detection of *M. leprae* in a tissue section from a case of leprosy. A and C, fluorescein filter set; B and D, Cy3-TAMRA filter set.

mycolic acids in mycobacterial cell walls. The development of PNA probes that enter mycobacteria without further pretreatment was, hence, a breakthrough. With a fluorescein-labeled PNA probe, Stender et al. (20) were able to differentiate between tuberculous and nontuberculous mycobacteria. The successful use of these probes was shown in different studies thereafter (2, 6, 15, 21).

Here we used four novel PNA probes to identify and visualize bacteria of the *M. tuberculosis* complex, as well as *M. leprae*, *M. avium*, and *M. kansasii*, in cultures and tissue sections.

To verify PNA-FISH for the detection of mycobacteria in the context of human cells, we first visualized single mycobac-

teria in BCG-infected APC as a well-defined experimental setting. Then we specifically detected *M. tuberculosis*, *M. leprae*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue sections of human and animal origin. So far, conventional ISH procedures (3, 4, 7, 8, 17) or antibody-based methods (13, 18) have shown only colored spots. Bacterial morphology could not be assessed. FISH with fluorescein-labeled PNA probes improved the detection but needed a signal amplification step because of low fluorescence intensity (24). Labeling of our probes with TAMRA or Cy3 resulted in advanced signal intensity and succeeded in direct FISH detection of mycobacteria in tissues. Although some of these tissues were formaldehyde fixed and embedded years ago (human tuberculosis in 1999, leprosy in

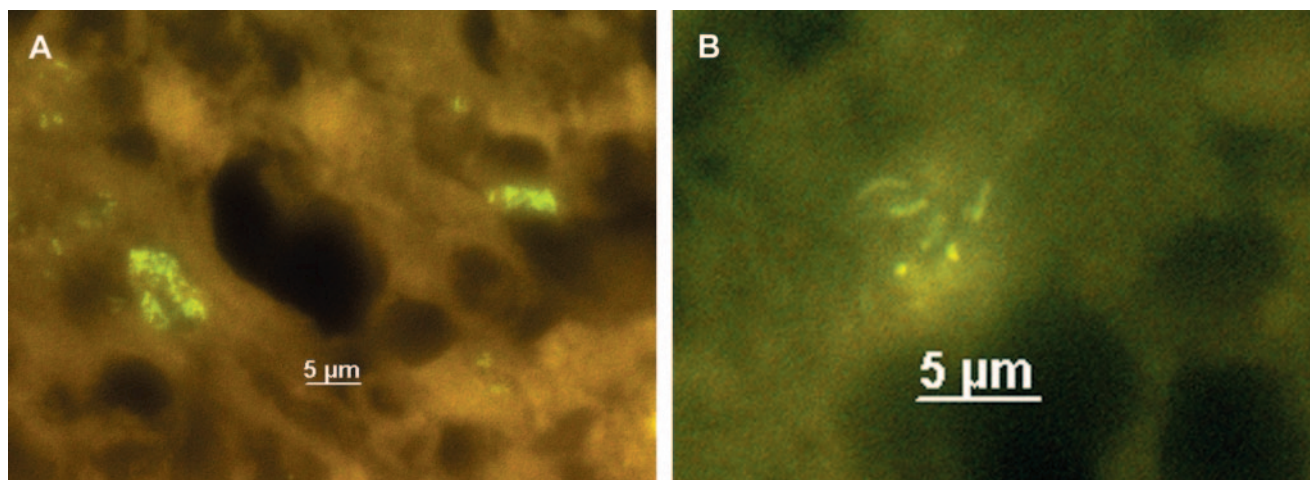


FIG. 5. Detection of *M. avium* in a tissue section from a case of Johne's disease in a cow by FISH (probe MAV_{TAMRA}). A and B, Cy3-TAMRA filter set.

2001, Johne's disease in 1999), we were able to detect mycobacteria with single-cell resolution.

In contrast to microscopic techniques like FISH, nucleic acid amplification-based methods are prone to contamination. In addition, they may be falsely negative because of the presence of amplification inhibitors such as eukaryotic and prokaryotic nontarget DNAs. In contrast, visualization of mycobacteria in a histopathological context allows unequivocal discrimination between true infection and contamination.

In addition, fluorescently labeled PNA probes represent an economical way to identify mycobacterial cultures isolated from clinical specimens. All 52 of the isolates included in this study were identified unequivocally as *M. tuberculosis*, *M. avium*, or *M. kansasii*, resulting in 100% sensitivity and specificity. Assuming a time to result of about 2.5 h with only 40 min of hands-on time for a FISH procedure (including fixation, hybridization, and microscopy) and considering its low cost, FISH might be an alternative to amplification-based methods for fast identification of commonly isolated mycobacterial species. An important advantage of using FISH is the fact that no biosafety level 3 laboratory is required.

The PNA-FISH probes shown here were able to distinguish between target sequences and sequences with single base mismatches. Probe composition and location of mismatches can limit the utility of PNA probes, and single base mismatches close to the 5' end of a probe complicated or even prevented specific hybridization, as shown by our experience with probes designed for *M. intracellulare*. There is little information on the effect of mismatch localization in PNA probes influencing hybridization specificity. According to our limited data set, a mismatch located in the middle of the probe has a better discriminative effect than a mismatch close to the 5' end.

Preliminary data show, however, that not all Ziehl-Neelsen-positive cells are visualized with PNA-FISH (data not shown). Further experiments will evaluate the performance of PNA-FISH in comparison with other methods (acid-fast staining, ISH with DNA probes, and amplification-based methods) for examination of tissue specimens.

In conclusion, we developed and validated four new PNA

probes in an improved FISH procedure to identify and visualize mycobacteria in cultures from clinical specimens and directly within tissue sections. PNA-FISH was shown to be a fast and versatile tool for both clinical microbiology diagnostics and research purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gitina Fiedler and Angela Pohlisch for excellent technical assistance. We are thankful to H. Audring (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, CCM, Charité, Berlin, Germany) and R. Rudolph (Veterinär-Pathologie, FB Veterinärmedizin, FU-Berlin, Berlin, Germany) for providing leprosy and Johne's disease tissue sections, respectively.

This work was supported in part by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Optimierte molekulare Bibliotheken, DFG no. GO 363/8-4) to U. B. Göbel. The epifluorescence microscope was a gift from the Sonnenfeld-Stiftung.

REFERENCES

1. **American Thoracic Society.** 1997. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**:1–25.
2. **Drobniewski, F. A., P. G. More, and G. S. Harris.** 2000. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacterial liquid cultures by using peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization probes. *J. Clinical Microbiol.* **38**:444–447.
3. **Fenhalls, G., L. Stevens-Muller, R. Warren, N. Carrol, J. Bezuidenhout, P. Van Helden, and P. Bardin.** 2002. Localization of mycobacterial DNA and mRNA in human tuberculous granulomas. *J. Microbiol. Methods* **51**:197–208.
4. **Fuller, C. L., J. L. Flynn, and T. A. Reinhart.** 2003. In situ study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **71**:7023–7034.
5. **Hernandez-Pando, R., M. Jeyanathan, G. Mengistu, D. Aguilar, H. Orozco, M. Harboe, G. A. Rook, and G. Bjune.** 2000. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* **356**:2133–2138.
6. **Hongmance, P., H. Stender, and O. F. Rasmussen.** 2001. Evaluation of a fluorescence in situ hybridization assay for differentiation between tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species in smears of Lowenstein-Jensen and Mycobacteria Growth Indicator Tube cultures using peptide nucleic acid probes. *J. Clinical Microbiol.* **39**:1032–1035.
7. **Hulten, K., H. M. El-Zimaity, T. J. Karttunen, A. Almashhrawi, M. R. Schwartz, D. Y. Graham, and F. A. El-Zaatari.** 2001. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. *Am. J. Gastroenterol.* **96**:1529–1535.
8. **Hulten, K., T. J. Karttunen, H. M. El-Zimaity, S. A. Naser, M. T. Collins, D. Y. Graham, and F. A. El-Zaatari.** 2000. Identification of cell wall deficient

- forms of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by in situ hybridization. *J. Microbiol. Methods* **42**:185–195.
9. **Lethola, M. J., E. Torvinen, I. T. Miettinen, and C. W. Keevil.** 2006. Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in potable-water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:848–853.
 10. **Metchock, B. G., F. S. Nolte, and R. J. Wallace.** 1999. *Mycobacterium*, p. 399–437. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C.
 11. **Moter, A., and U. B. Göbel.** 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **41**:85–112.
 12. **Moter, A., C. Hoenig, B. K. Choi, B. Riep, and U. B. Göbel.** 1998. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J. Clinical Microbiol.* **36**:1399–1403.
 13. **Naser, S. A., I. Shafran, D. Schwartz, F. El-Zaatari, and J. Biggerstaff.** 2002. In situ identification of mycobacteria in Crohn's disease patient tissue using confocal scanning laser microscopy. *Mol. Cell. Probes* **16**:41–48.
 14. **Oda, Y., S. J. Slagman, W. G. Meijer, L. J. Forney, and J. C. Gottschal.** 2000. Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridization of *Rhodospseudomonas palustris*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:205–213.
 15. **Padilla, E., J. M. Manterola, O. F. Rasmussen, J. Lonca, J. Dominguez, L. Matas, A. Hernández, and V. Ausina.** 2000. Evaluation of a fluorescence hybridization assay using peptide nucleic acid probes for identification and differentiation of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in liquid cultures. *Eur. J. Clinical Microbiol. Infect. Dis.* **19**:140–145.
 16. **Perry-O'Keefe, H., H. Stender, A. Broomer, K. Oliveira, J. Coull, and J. J. Hyldig-Nielsen.** 2001. Filter-based PNA in situ hybridization for rapid detection, identification and enumeration of specific microorganisms. *J. Appl. Microbiol.* **90**:180–189.
 17. **Sechi, L. A., M. Mura, F. Tanda, A. Lissia, A. Solinas, G. Fadda, and S. Zanetti.** 2001. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by in situ hybridization. *J. Clinical Microbiol.* **39**:4514–4517.
 18. **Seiler, P., T. Ulrichs, S. Bandermann, L. Pradl, S. Jorg, V. Krenn, L. Morawietz, S. H. Kaufmann, and P. Aichele.** 2003. Cell-wall alterations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infection. *J. Infect. Dis.* **188**:1326–1331.
 19. **Stender, H., M. Fiandaca, J. J. Hyldig-Nielsen, and J. Coull.** 2002. PNA for rapid microbiology. *J. Microbiol. Methods* **48**:1–17.
 20. **Stender, H., K. Lund, K. H. Petersen, O. F. Rasmussen, P. Hongmanee, H. Miörner, and S. E. Godtfredsen.** 1999. Fluorescence in situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species in smears of *Mycobacterium* cultures. *J. Clinical Microbiol.* **37**:2760–2765.
 21. **Stender, H., T. A. Mollerup, K. Lund, K. H. Petersen, P. Hongmanee, and S. E. Godtfredsen.** 1999. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-positive sputum samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **3**:830–837.
 22. **Sweeney, R. W.** 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clinical N. Am. Food Anim. Pract.* **12**:305–312.
 23. **World Health Organization.** Revised August 2002. Tuberculosis fact sheet no. 104. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
 24. **Zerbi, P., A. Schonau, S. Bonetto, A. Gori, G. Costanzi, P. Duca, and L. Vago.** 2001. Amplified in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous *Mycobacterium* species on formalin-fixed, paraffin embedded archival biopsy and autopsy samples. *Am. J. Clinical Pathol.* **116**:770–775.

2.2.3.2. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, fluoreszenz-markierte PNA-Sonden für die Detektion und Identifikation von Mykobakterien mittels FISH zu entwickeln. Die Sonden erlaubten eine spezifische Hybridisierung von *M. tuberculosis* Komplex, *M. avium*, *M. kansasii* und *M. leprae*. Die Sonden unterschieden dabei zwischen Stämmen mit 100% homologen Zielsequenzen und Spezies mit einer einzigen Fehlpaarung an der Sondenbindungsstelle. Die Spezifität der Sonden wurde anhand eines Panels von 25 *Mycobacterium* spp. und 10 weiteren Gram-positiven Spezies ausgetestet und bestätigt. Im Anschluss wurde die optimierte PNA-FISH an 52 klinischen Isolaten aus konsekutiven Flüssigkulturen für die Anwendung in der Routinediagnostik geprüft. Alle entsprechenden Isolate (24 Stämme *M. tuberculosis* Komplex, 7 Stämme *M. avium* und 1 *M. kansasii* Isolat) wurden korrekt durch die PNA-FISH identifiziert. Dabei konnte das Protokoll in weniger als drei Stunden bei praktischen Arbeiten von circa 30 Minuten durchgeführt werden.

Weiterhin wurde die PNA-FISH für den *in situ* Nachweis von Mykobakterien im Gewebe benutzt. Hier konnte spezifisch *M. tuberculosis* Komplex in experimentellen Zellkulturen und einem MTBC Mausmodell nachgewiesen werden, und darüber hinaus auch in der Lungenbiopsie eines Tuberkulosepatienten. Mit der *M. avium* spezifischen Sonde konnten die entsprechenden Mykobakterien im Gewebe eines Rindes mit Paratuberkulose nachgewiesen werden. Auch der *in situ* Nachweis von *M. leprae* in einer Hautbiopsie eines Leprapatienten war erfolgreich und zeigte eindrucksvoll zahlreiche klar abzugrenzende Mikroorganismen sowie einzelne Mykobakterien im histologischen Schnitt. Dem spezifischen *in situ* Nachweis von *M. leprae* kommt besondere Bedeutung zu, da diese Spezies bisher nicht kultivierbar ist, und molekularbiologische Nachweissysteme fehlen.

Die PNA-FISH stellt somit ein schnelles, kostengünstiges Verfahren zur *in situ* Visualisierung und Identifikation von Mykobakterien in histologischen Schnitten dar und eignet sich sowohl für den Einsatz in experimentellen Studien als auch für die Routinediagnostik.

2.2.3.3. Ausblick

Da auch für die PNA-Sonden die ribosomale RNA die Zielstruktur sind, und RNA avitaler Zellen zeitnah von RNAsen abgebaut wird, kann man davon ausgehen, dass FISH-positive Bakterien zum Zeitpunkt der Fixierung beziehungsweise kurz davor einen hohen RNA-Gehalt und somit vermutlich noch metabolische Aktivität besaßen. Bei der PNA-FISH von Geweben fiel auf, dass nicht alle Mykobakterien ein gleichermaßen starkes FISH-Signal durch die spezifischen wie auch die EUB-PNA-

Sonden aufwiesen und dass durch die Ziehl-Neelsen Färbung mehr Mykobakterien nachweisbar waren als durch die FISH. Auch in den Granulomen des Tuberkulosepatienten zeigte sich eine randständige Organisation der FISH-positiven Zellen. Es ist somit denkbar, dass mit Hilfe der FISH eine Aussage über die metabolische Aktivität oder Latenz getroffen werden kann. Das ist insbesondere vor dem Hintergrund der grundsätzlich verschiedenen Verlaufsformen der tuberkulösen versus lepromatösen Lepra interessant und wird derzeit in einer Kooperation mit Dr. Alberto Paniz, Department of Pathology, Beth Israel Medical Center, New York, untersucht.

2.3. Analyse komplexer mikrobieller Biofilme

2.3.1. Nachweis bisher nicht kultivierter Mikroorganismen in Biofilmen am Beispiel der Parodontitis

Die Parodontitis als polymikrobielle Erkrankung ist die häufigste Ursache für Zahnverlust. Charakteristisch ist eine chronische Infektion des Zahnhalteapparates, welche zur Ausbildung von eitrigen Zahntaschen mit einer reichen Mikroflora führt. In Folge kommt es zur Rückbildung des Zahnfleisches, des Periodontiums und Knochens und im schlimmsten Fall zum Zahnausfall. Die Parodontitis hat bei Erwachsenen eine Prävalenz von ca. 30% in der europäischen Bevölkerung. Dabei sind die Unterschiede bezüglich Parodontitis und Zahnverlust innerhalb Europas erheblich. Die beste Zahngesundheit fand sich in Schweden, Spanien und der Schweiz, während Deutschland eine hohe Zahnverlustquote und den höchsten Zahnfleisch-Attachmentverlust in Europa hat (59). Für die Forschung stellt diese komplexe Entzündung des Zahnhalteapparates eine besondere Herausforderung dar und dient gleichzeitig als Parademodell für chronische Biofilmerkrankungen.

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die Beobachtung, dass im subgingivalen Plaquematerial von Parodontitispatienten der überwiegende Teil der bakteriellen Morphotypen Spirochäten waren, von denen sich jedoch nur einige wenige Spezies anzüchten ließen. Daher wurde ein molekulargenetischer Zugang gewählt, um die Identität dieser Spirochäten zu klären. Nach Amplifikation der ribosomalen RNA-Gene, Klonierung und Sequenzierung fand sich eine unerwartet hohe Vielfalt oraler Treponemen in einem einzelnen subgingivalen Plaquematerial eines Parodontitispatienten (19).

Treponemen:

In der Familie *Spirochaetaceae* umfasst die Gattung *Treponema* zahlreiche Spezies, die aufgrund ihrer hochspeziellen, weitgehend unbekanntem Nährstoffbedürfnisse und ihres empfindlich auf die Wirtszelle angewiesenen Stoffwechsels zum Großteil bisher nicht kultiviert sind. Diese schmalen, helikal geformten Mikroorganismen sind mit ihrer Länge von 5-20 µm und 0.1-0.4 µm Durchmesser am besten in der Dunkelfeldmikroskopie oder nach einer Silberimprägnierung zu betrachten, da sie aufgrund ihres zarten Erscheinungsbildes in üblichen Färbungen leicht zu übersehen sind. Unter ihren humanpathogenen Vertretern ist *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, der Erreger der Syphilis, wohl einer der bekanntesten. Die größte Gruppe

von Treponemen wurde jedoch bisher innerhalb der oralen Spirochäten gefunden und ihre Vielfaltigkeit lange unterschätzt, da sie neben wenigen anzüchtbaren Treponemen erst nach Einführung kulturunabhängiger Nachweismethoden mittels 16S rRNA-Gen Sequenzanalyse identifiziert werden konnten. Sie umfasst nach gegenwärtigen Schätzungen annähernd 80 verschiedene Phylotypen von *Treponema* (19, 26, 89).

Molekularbiologische Epidemiologie oraler Treponemen bei der Parodontitis

Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, die Treponemen-Phylotypen, welche aus der Klonbank eines einzelnen Patienten stammten, auch bei anderen Parodontitispatienten nachzuweisen und zu ermitteln, welche Treponemen besonders häufig mit der aggressiven Parodontitis assoziiert sind.

Patientenkollektiv und Probennahme:

In die Studie wurden 53 Patienten eingeschlossen, die an generalisiert, aggressiver Parodontitis (GAP) litten. Alle Patienten waren bis dahin parodontologisch unbehandelt. Patienten mit chronischen Grunderkrankungen, Schwangere, Immunsupprimierte oder Patienten, die in den vergangenen sechs Monaten antimikrobielle Therapie oder immunsuppressive Therapie erhalten hatten, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Insgesamt 244 subgingivale Plaqueproben wurden mit Hilfe von sterilen Papierspitzen nach supragingivaler Zahnreinigung gewonnen. Dabei wurden pro Patient jeweils die vier tiefsten Zahntaschen beprobt und wenn möglich von einer flachen Stelle ohne Entzündungszeichen eine Kontrollprobe genommen. Die Proben wurden sofort in ein sauerstoffarmes Transportmedium gegeben und im Labor für die Dunkelfeldmikroskopie, DNA-Extraktion und FISH-Fixierung geteilt.

Dunkelfeldmikroskopie: In der Dunkelfeldmikroskopie wurden bei allen 53 Patienten Spirochäten nachgewiesen, wobei die tiefen Zahntaschen häufiger (197 von 200 Proben) positiv waren als die Kontrollproben (19 von 44 Proben) und teilweise sehr hohe Zahlen von ≥ 100 Spirochäten im mikroskopischen Gesichtsfeld aufwiesen.

Oligonukleotidsonden: Anhand der 16S rRNA-Genbank der oralen Treponemen des Parodontitispatienten (19) wurden die folgenden Oligonukleotidsonden entwickelt: die Sonden TRE I bis TRE VII für die phylogenetischen Gruppen 1-7, und für die kultivierbaren Spezies oraler Treponemen, *T. denticola*, *T. vincentii*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum* und *T. maltophilum*. Zusätzlich wurde die Sonde EUB338 als Kontrolle der Dot-Blot Hybridisierung eingesetzt.

Dot-Blot Hybridisierungen: Die Prävalenz der Treponemen wurde zunächst durch Dot-Blot Hybridisierungen untersucht. Hierfür wurde durch einen Lysis-Schritt die bakterielle DNA in den subgingivalen Proben freigesetzt. In einer PCR-Reaktion wurde mit pan-bakteriellen Primern ein ca. 530 Bp langes Fragment der gesamten bakteriellen 16S rRNA-Gene amplifiziert. Erfolgreiche Amplifikation wurde durch Agarosegelelektrophorese verifiziert. Die PCR-Produkte wurden denaturiert und auf Nylonmembranen aufgetropft. Für die Kontrolle spezifischer Hybridisierungsbedingungen wurden ebenfalls PCR-Produkte der *Treponema* Spezies und -Phylotypen sowie einiger bekannter oraler Bakterienspezies mitgeführt.

Die Oligonukleotidsonden wurden mit Digoxigenin markiert und durch ein Chemilumineszenzverfahren detektiert. Für jede Sonde wurde einzeln die optimale stringente Hybridisierungsbedingung ermittelt.

Hybridisierung mit der bakteriellen Sonde EUB338 zeigte bei allen Proben ein starkes Hybridisierungssignal, so dass eine erfolgreiche PCR Amplifikation der ribosomalen RNA-Gene und korrekte Dot-Blot Hybridisierung bestätigt wurden. Für alle Treponemen-spezifischen Sonden ließen sich stringente Hybridisierungsbedingungen herstellen, so dass auf der Kontrollmembranen nur die entsprechenden Positivkontrollen sichtbar waren.

Prävalenz oraler Treponemen bei generalisiert aggressiver Parodontitis: Bei den Patientenproben konnten außer *T. pectinovorum* alle Phylotypen oraler Treponemen detektiert werden. Die meisten Phylotypen wurden signifikant häufiger in den tiefen Zahntaschen als in den Kontrollstellen nachgewiesen. Die meisten Proben waren für *T. socranskii* (96,2 % aller Patienten), Gruppe I und Gruppe IV Treponemen (mit jeweils 100% der Patienten) positiv. Die Gruppen III, V, VI und VII waren in 49,1%, 20,8%, 7,5% und 39,6% der Fälle positiv. Diese Ergebnisse bestätigten zum einen, dass die Phylotypen, welche aus der Klonbank eines einzigen Plaquematerials stammten, epidemiologisch relevant sind, und zum anderen, dass orale Treponemen bei GAP generell hochprävalent sind.

Interessanterweise gab es eine große Diskrepanz zwischen der Anzahl positiver Proben für die gruppen-spezifischen Sonden und der Anzahl Proben, die positiv für die spezies-spezifischen Sonden kultivierbarer Treponemen der entsprechenden Gruppe waren. So waren zum Beispiel Gruppe I Treponemen in 88,5% aller tiefen Zahntaschen nachweisbar, während der kultivierbare Vertreter der Gruppe I, *T. vincentii* nur in 9% der tiefen Zahntaschen gefunden wurde. Daraus konnte man schließen, dass es in der Tat eine große Zahl bisher nicht kultivierter Treponemen in den Zahntaschen von Parodontitispatienten gibt, was auch die Beobachtung

zahlreicher Spirochäten im Dunkelfeld bei negativem Kulturbefund erklärte. Aber auch Proben, in denen mikroskopisch keine Spirochäten in der Dunkelfeldmikroskopie erkannt wurden, zeigten starke Signale in der Dot-Blot Hybridisierung mit Treponemen-spezifischen Sonden, was auf eine deutlich höhere Sensitivität durch die PCR-Amplifikation zurückzuführen ist.

FISH-Nachweis oraler Treponemen: Die Dot-Blot Hybridisierungen zeigte zwar sequenzbasiert eine hohe Prävalenz von Treponemen-Phylotypen, konnte aber keinen Aufschluss darüber geben, ob die detektierten Mikroorganismen tatsächlich den Spirochäten-Morphotyp aufwiesen, und welchen Anteil sie an der oralen Flora haben. Daher wurden die identischen Sondensequenzen, welche für den Dot-Blot entwickelt worden waren, als fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide in der FISH eingesetzt.

FISH mit einer Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten pan-bakteriellen Sonde zeigte zunächst die morphologische Vielfalt in dem subgingivalen Plaquematerial. In der simultanen Hybridisierung mit einer Cy3-markierten Sonde für Gruppe I Treponemen kamen zahlreiche Spirochäten-Morphotypen zur Darstellung. In dem in der Publikation dargestellten Fall waren pro Gesichtsfeld mehr als 10 Gruppe I Treponemen zu zählen, welche circa ein Drittel der dargestellten oralen Flora ausmachten. Da bei diesem Patienten in der Dot-Blot Hybridisierung der kultivierbare Vertreter der Gruppe I, *T. vincentii* nicht nachweisbar war, konnte man davon ausgehen, dass alle dargestellten Treponemen zu den bisher nicht kultivierten Spezies gehören. Neben dem spiralförmigen Morphotyp wurden jedoch auch ringförmige Bakterien durch die *Treponema* Gruppe I Sonde detektiert. Diese entsprechen den Rundformen, welche für verschiedene Spirochäten beschrieben sind und von denen diskutiert wird, ob es sich um lebendige Dauerformen, oder aber um im Absterben begriffene Mikroorganismen handelt. Die sehr starke Signalintensität in der FISH spricht dabei eher für einen vitalen Zustand der Treponemen.

Bei gleichzeitiger Hybridisierung des Plaquematerials mit der FITC-markierten Gruppe I Sonde (grün) und der Cy3-markierten Gruppe II Sonde (gelb), zeigten sich zwei morphologisch verschiedene Entitäten. Während die Gruppe I Treponemen relativ lang, dick und locker gewunden waren, stellten sich die Gruppe II Treponemen als kleine, zarte und gleichmäßig eng gewundene Spirochäten dar. Das bedeutet, dass die eigentlich theoretische Einteilung der Treponemen anhand der 16S rRNA Sequenz hier ihr morphologisches Korrelat findet und es unterstützt die Rolle der ribosomalen RNA als phylogenetisches, evolutionäres Marker-Gen.

Beteiligung der Treponemen an der Pathogenese der Parodontitis: Es fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen der hohen Prävalenz von Treponemen in den tiefen Zahntaschen und den geringen Nachweisraten in den Proben, die von nicht entzündlich veränderten Stellen genommen worden waren. Die Treponemen, die in den infektionsfreien Stellen gefunden wurden, könnten durch die hohe Keimzahl in den tiefen Zahntaschen herübergespült worden sein. Es könnte sich aber auch um eine beginnende parodontale Infektion handeln. So sind die hier dargestellten Daten ein starker Hinweis auf eine hohe Assoziation von oralen Treponemen mit der Parodontitis. Es ließ sich in dieser Studie aber nicht abschließend klären, ob die Treponemen maßgeblich an der Pathogenese der Parodontitis beteiligt sind. Auf jeden Fall müssen jedoch diese bisher nicht kultivierten Mikroorganismen bei Untersuchungen zur Entstehung und Pathogenese der Parodontitis unbedingt Beachtung finden.

Molecular Epidemiology of Oral Treponemes Associated with Periodontal Disease

ANNETTE MOTER,¹ CARINA HOENIG,¹ BONG-KYU CHOI,² BIRGIT RIEP,³ AND ULF B. GÖBEL^{1*}

*Institut für Mikrobiologie und Hygiene¹ and Abteilung Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin,³
Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany, and
Department of Oral Biology, Yonsei University, Seoul, Korea²*

Received 14 October 1997/Returned for modification 4 December 1997/Accepted 6 January 1998

Periodontitis, a disease responsible for tooth loss worldwide, is characterized by chronic inflammation of the periodontium, eventually leading to destruction of periodontal ligaments and supporting alveolar bone. Spirochetes, identified by dark-field microscopy as being the most predominant bacteria in advanced lesions, are thought to play a causative role. Various spirochetal morphotypes were observed, but most of these morphotypes are as yet uncultivable. To assess the role of these organisms we designed oligonucleotide probes for the identification of both cultivable and so far uncultivable spirochetes in periodontitis patients. Subgingival plaque specimens taken from diseased sites ($n = 200$) and healthy control sites ($n = 44$) from 53 patients with rapidly progressive periodontitis (RPP) were submitted to direct in situ hybridization or dot blot hybridization after prior amplification with eubacterial primers. Spirochetes were found in all patients, but their distributions varied considerably. Parallel use of oligonucleotide probes specific for cultivable or so far uncultivable treponemes suggested the presence of novel yet unknown organisms at a high frequency. These uncultivable treponemes were visualized by fluorescence in situ hybridization, and their morphologies, sizes, and numbers could be estimated. All RPP patients included in this study harbored oral treponemes that represent either novel species, e.g., *Treponema maltophilum*, or uncultivable phylotypes. Therefore, it is necessary to include these organisms in etiologic considerations and to strengthen efforts to cultivate these as yet uncultivable treponemes.

Treponemes comprise a large group of spirochetes found in important infections such as syphilis or periodontal disease (12). While the role of *Treponema pallidum* in the pathogenesis of syphilis is well documented, the etiologic role of oral treponemes in periodontitis is postulated on the basis of the presence of elevated numbers of these organisms in periodontal lesions (9, 21). Spirochetes predominate in most patients who have chronic periodontal disease but who have not responded to therapy. Although various spirochetal morphotypes have been observed, most of these have not been cultured. Among the four cultivable oral treponema species presently recognized, *Treponema denticola* has been most frequently associated with chronic periodontal disease. However, it remains to be determined whether this organism is of etiologic relevance or merely the most easily cultured organism. Recent molecular genetic analyses revealed an unexpected diversity of treponema sequences in a subgingival plaque sample from a single periodontitis patient (5). More than 50 treponemal rRNA sequences were found, and these clustered into eight major taxonomic groups (groups I to VIII) exhibiting $\geq 92\%$ sequence similarity. These groups could be divided into 23 phylotypes exhibiting $\geq 98\%$ sequence homology, hence representing mostly novel yet uncultivable treponema species. In light of this observation it was necessary to reassess the etiologic role of oral treponemes in periodontal disease by applying methods that detect both cultivable and as yet uncultivable organisms. We synthesized a number of group- or phylotype-specific oligonucleotide probes to determine the frequency of known and

novel organisms in subgingival plaque samples from 53 patients with rapidly progressive periodontitis (RPP) by dot blot or in situ hybridization.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples. A total of 244 subgingival plaque specimens (200 specimens from deep periodontal pockets and 44 specimens from healthy control sites) from 53 RPP patients (average age, 34.7 years) were investigated. All patients were previously untreated. The patients received a diagnosis of RPP according to their advanced clinical and radiographical appearance in combination with their age and their history of periodontal disease, following the criteria of Page et al. (20). Patients who had chronic disease or patients who had received anti-inflammatory or antimicrobial therapy within the previous 6 months were excluded from the study. Subgingival plaque samples were taken from diseased sites with a probing pocket depth of ≥ 6 mm and bleeding on probing. Whenever possible a sample from an additional control site not clinically affected by the disease was selected. After supragingival plaque removal with a sterile curette and cotton pellet, three sterile paper points (ISO 35; Becht, Offenburg, Germany) were inserted into the pockets. After 10 s the paper points were removed and placed into 1 ml of reduced transport fluid (32) containing 25% glucose, transferred to the laboratory, and processed immediately.

Dark-field microscopy. The total bacterial cell count in all samples was estimated by dark-field microscopy. The number of spirochetes was determined semiquantitatively as counts per microscopic field at $\times 1,000$ magnification.

DNA extraction and amplification. Aliquots of the plaque specimen of 100 μ l were centrifuged at 13,000 $\times g$ for 10 min in a Labofuge 400 R centrifuge (Heraeus, Hanau, Germany). The resulting bacterial pellets were placed in 100 μ l of lysis buffer as described previously (5). No further purification of nucleic acids was performed. One microliter of bulk DNA was then added to the amplification mixture (final reaction volume, 100 μ l) for in vitro amplification by PCR in a thermal cycler (Trioblock; Biometra, Göttingen, Germany) for 30 cycles of denaturation (1 min, 95°C), annealing (1 min, 56°C), and extension (1 min, 72°C). The broad-range eubacterial primers used for 16S rRNA gene amplification were TPU1 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; corresponding to positions 8 to 27 in the *Escherichia coli* 16S rRNA gene) (4) and RTU3 (5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'; corresponding to complementary positions 519 to 536 in *E. coli* 16S rRNA) (4). Successful amplification was verified by agarose gel electrophoresis.

Oligonucleotide probes. Oligonucleotide probes TRE I to TRE VII specific for all major phylogenetic clusters of oral treponemes were designed according

* Corresponding author. Mailing address: Universitätsklinikum Charité, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Dorotheen-Str. 96, D-10117 Berlin, Germany. Phone: 49 30 2093 4715. Fax: 49 30 2292 741. E-mail: goebel@rz.charite.hu-berlin.de.

to the phylogenetic tree retrieved from an earlier comparative 16S rRNA analysis (5). The sequences of these probes were as follows: TRE I, 5'-ACGCAAG CTCATCCTCAAG-3'; TRE II, 5'-GCTCTTTTCCTCATTACCTTTAT-3'; TRE III, 5'-CCCAATCTTAAAGGTAGATCAC-3'; TRE IV, 5'-CGGTGTTTCGGTATTACTACT-3'; TRE V, 5'-CCTTTATTCGGTGAGACCTTAT C-3'; TRE VI, 5'-GTGGGCGCGTCCACGCGTTAC-3'; and TRE VII, 5'-CCCATCCGAGAGGTACGTCATCCA-3'.

To assess specificity, the sequences of the probes were compared with those of all 16S rRNA entries at the EMBL and GeneBank databases currently (July 1997) accessible by using the program BLASTN of the Husar (version 4.0; Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) program package (DKFZ, Heidelberg, Germany). Probes TDEN, TVIN, TSOC, TPEC, and TMAL were designed to detect the known cultivable treponemes *T. denticola*, *T. vincentii*, *T. socranskii*, and *T. pectinovorum* or a novel, recently described species, *T. maltophilum* (34), respectively. The sequences of these probes were as follows: TDEN, 5'-CATGACTACCGTCATCAAAGAAGC-3'; TVIN, 5'-ATTGAGACTATTC GGTTATTACCTGC-3'; TSOC, 5'-CATTGCTGCCTGCCGCTCGACTTG-3'; TPEC, 5'-CTCCAATTATATGACCTTATCCG-3'; and TMAL, 5'-CTATTG TGCTTATTCATCAGGC-3'. All probes were checked for their practical use in hybridization experiments by using the program OLIGO (version 4.0). The probe EUB338, complementary to a region of the 16S rRNA gene conserved in the domain Bacteria, was used as a positive control (2).

Dot blot hybridization. Dot blot hybridization of PCR-amplified plaque material was used to detect minute amounts of treponemes and to determine their presence in individual patients. After denaturation of PCR products, aliquots of 1 μ l were spotted onto nylon membranes (Hybond N; Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) and were fixed by UV cross-linking (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). A total of 34 products of amplified DNA from either recombinant clones retrieved from the original 16S rRNA gene library, known cultivable treponemes, or other putative periodontal pathogens were included as controls in all dot blot hybridizations. All probes were labeled nonisotopically with digoxigenin (DIG)-ddUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) and were detected by chemiluminescence according to the manufacturer's recommendations. All hybridizations were performed at 54°C. Stringency washes were performed at temperatures of between 56 and 64°C with a washing buffer containing 5 \times SSC (1 \times SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)-0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS) or 0.1 \times SSC-0.1% SDS, depending on the respective probe. DIG-labeled probes were detected with anti-DIG-alkaline phosphatase conjugates after adding the appropriate substrate according to the manufacturer's recommendations. X-ray films were exposed to the membranes for 2 to 12 h. After stripping with 0.2 N NaOH-0.1% SDS (stripping buffer), identical membranes were used for multiple hybridization experiments with the probes mentioned above.

Statistical analysis. Statistical evaluation of the dot blot hybridization results was done by the chi-square test. The site-specific data were regarded as independent.

In situ hybridization. In situ hybridization was performed to determine the frequency of occurrence of specific treponemes in a given subgingival plaque sample. For fixation of cells, 100 μ l of a subgingival plaque sample suspension was pelleted at 5,200 \times g for 10 min and washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Finally, the cells were resuspended in 100 μ l of PBS with 3.7% (vol/vol) formaldehyde. Fixed cells (2 μ l) were spotted onto gelatin-coated [0.01% KCr(SO₄)₂ (wt/vol), 0.1% gelatin (wt/vol)] microscopic slides (Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim, Germany), air dried, and dehydrated in 50, 80, and 96% (vol/vol) ethanol.

Oligonucleotides identical to those used for the dot blot experiments were used for the in situ hybridizations. Fluorescence labeling was performed with 5-amino-propargyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate coupled to Cy3 fluorescent dye (Cy3-dCTP; Amersham Life Sciences, Arlington Heights, Ill.) or fluorescein-12-dUTP (Boehringer Mannheim) and terminal transferase (Boehringer Mannheim).

For whole-cell hybridization, a 10- μ l aliquot of the hybridization mix containing 20 mM Tris HCl, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS, 0 to 20% formamide, and approximately 50 ng of the fluorescent probe were applied to each sample on microscopic slides. After 1 to 3 h of hybridization at 46°C in a moist chamber in the dark, each of the slides was washed for 30 min in preheated (46°C) washing buffer containing 20 mM Tris HCl, 0.01% SDS, and 0.9 to 0.225 M NaCl (depending on the formamide concentration used during hybridization) to ensure stringency. Finally, the slides were mounted with Citifluor AF1 (The Chemical Laboratory of the University of Kent, Kent, United Kingdom). The bacteria were observed with an Axioskop microscope (Zeiss, Jena, Germany) with the respective filter combinations (HQ filter sets F41-007 and F41-001; AHF Analysetechnik, Tübingen, Germany) at a magnification of \times 1,000. For documentation, photomicrographs were taken with Kodak Ektachrome HC 400 film.

RESULTS

Dark-field microscopy. Spirochetes were found in all 53 RPP patients. They were detected in 197 of 200 deep periodontal pockets and 19 of 44 control sites. Their numbers varied from none to about 10/microscopic field at healthy sites and about 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A								*	•	•	•	•	•	•	•
B	•							•	•	•	•	•	•	•	•
C	•				•	•			•			•	•	•	•
D		•		•				•			•	•		•	•
E				*	*	*	*	*						•	•

a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A								*							
B	•														
C						•									
D															
E				*	*	*	*	*							

b

FIG. 1. Dot blot hybridizations of identical membranes with group-specific probe TRE I (a) and species-specific probe TVIN (b). The strains were kindly provided by R. Mutters, Marburg, Germany (identified as RM); C. Wyss, Zürich, Switzerland (identified as CW); and B. Wilske, Munich, Germany (identified as BW). In columns 1 to 8 PCR products of the following strains were applied as controls: the putative oral pathogens *Actinobacillus actinomycetemcomitans* MCCM 02638 (A1) (RM), *Capnocytophaga gingivalis* MCCM 00858 (A2), (RM), *Capnocytophaga ochracea* MCCM 00238 (A3) (RM), *Eubacterium lentum* ATCC 25559^T (A4) (RM), *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586^T (A5) (RM), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (A6) (RM), and *Prevotella intermedia* MCCM 00407 (A7) (RM); the cultivable treponema species *T. vincentii* ATCC 35580 (B1), *T. denticola* ATCC 35405^T (B2), *T. socranskii* subsp. *socranskii* ATCC 35536 (B3), *T. socranskii* subsp. *buccale* ATCC 35534 (B4), *T. maltophilum* ATCC 51939^T (B5) (CW), and *T. phagedenis* subsp. *reiterii* (B6) (BW); a clinical isolate (CW) (B8; highest degree of homology to clone NZM 3142), and *T. pectinovorum* ATCC 33768^T (E1); group I recombinant clones NZM3D292 (C1), NZM3D464 (C5), NZM3112 (C6; sequence 100% homologue to probe TVIN), NZM3142 (D2), NZM3147 (D4), and NZM3166 (D7); group II recombinant clones NZM3106 (C7) and NZM3158 (D6); group III recombinant clones NZM3143 (D3), NZM3D298 (C3), and NZM3D527 (C4); group IV recombinant clones NZM3122 (C8), NZM3D505 (C2), and NZM3125 (D8); group V recombinant clones NZM3124 (D1) and NZM3155 (D5); the group VI recombinant clone NZM3104 (E2); and the group VII recombinant clone NZM3D384 (E3). In columns 9 to 15 PCR products from subgingival plaque samples were applied; lanes A to D, PCR products from deep periodontal pockets; lane E, PCR products from the respective controls.

to $\geq 10^2$ /microscopic field (\times 1,000 magnification; average of 10 microscopic fields) at diseased sites.

Dot blot hybridization. A strong hybridization signal was obtained with the eubacterium-specific probe EUB338 for all subgingival plaque specimens, indicating that PCR amplification was not hampered by the presence of inhibitors. Accordingly, all negative controls, i.e., samples that contained no DNA, showed no hybridization signal, suggesting a lack of contamination by carryover of amplified material. All 34 controls containing amplified DNA from either recombinant clones of the 16S rDNA gene library mentioned above, known cultivable treponemes, or relevant putative periodontal pathogens were detected only by the respective probe. No cross hybridization was observed (Fig. 1). With the exception of *T. pectinovorum*, which has not been found in any specimen, all other treponemal phylotypes were detected. All phylotypes except group VI organisms ($P = 0.180$) and *T. vincentii* ($P = 0.040$) were detected significantly more often in the deep periodontal pockets than in the respective control sites ($P <$

TABLE 1. Distribution of cultivable and uncultured oral treponemes in RPP patients

Oligonucleotide probe group and probe	% Positive patients ^a	
	Deep periodontal pockets (n = 53)	Control sites (n = 44)
Group-specific probes		
TRE I	100.0	34.1
TRE II	86.8	15.9
TRE III	49.1	6.8
TRE IV	100.0	47.7
TRE V	20.8	0.0
TRE VI	7.5	0.0
TRE VII	39.6	2.3
Species-specific probes		
TVIN	20.8	0.0
TDEN	62.3	4.5
TMAL	66.0	9.1
TSOC	96.2	20.5
TPEC	0.0	0.0

^a At least one positive site, as analyzed by dot blot hybridization.

0.005). *T. socranskii* and group I and IV organisms were present in more than 85% of the deep subgingival pockets and in 96.2 and 100% of the patients, respectively (Table 1). In contrast, group III, V, VI, and VII oral treponemes were found in only 49.1, 20.8, 7.5, or 39.6% of the patients, respectively. Great discrepancy was observed for cultivable and as yet uncultivable treponemes of groups I and II. While *T. vincentii*, the only group I treponemal species cultivable so far, was found in 20.8% of the patients and in only 9% of all deep pockets and none of the control sites, probe TRE I detected treponemes in each patient and in 88.5% of diseased sites and 34.1% of control sites (Fig. 1 and 2). A similar discrepancy was observed for probes TRE II and TDEN. Although *T. denticola* was found in about 40% of diseased sites and 2.3% of healthy sites, as yet uncultivable treponemes detected by probe TRE II were found in 72% of affected sites and 15.9% of unaffected sites (Fig. 2).

In situ hybridization. The results of in situ hybridization experiments with oligonucleotide probes and patient specimens identical to those used for dot blot hybridization complemented the dot blot hybridization results and indicated that these organisms are present in high proportions in subgingival plaque samples and thus represent the predominant flora. Fig-

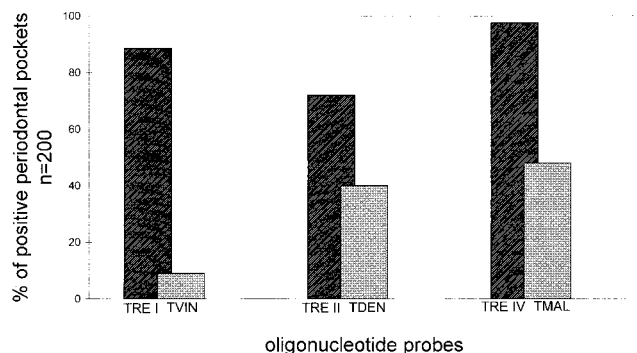


FIG. 2. Presence of cultivable versus uncultivable oral treponemes in RPP patients revealed by dot blot hybridization with group-specific probes (probes TRE I, TRE II, and TRE IV) and species-specific probes (probes TVIN, TDEN, and TMAL).

ure 3a shows a microphotograph from representative subgingival plaque material after simultaneous hybridization with the fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled probe EUB338 and the Cy3-labeled probe TRE I. With the FITC filter set the diversity of the microbial community in the periodontal plaque sample could be observed, since bacteria of all different morphologies and sizes were stained (green). With the Cy3 filter combination, group I treponemes appeared as large, thick spirochetes (yellow). Because in this sample *T. vincentii*, the only cultivable species of group I, was not detected by dot blot hybridization, we assume that these spirochetes are as yet uncultivable. In situ hybridization of the same patient material with TRE I_{FITC} and TRE II_{Cy3} revealed that group II treponemes are rather small and thin with many waves and occurred less frequently than group I treponemes in this specimen (Fig. 3b).

DISCUSSION

As with most other mixed infections, conceptual and technical difficulties were encountered in searches for the etiologic agents of periodontal infections (7, 11, 18, 31). In the past, dark-field microscopy and culture-based methods have been used to link the presence of elevated numbers of one or more organisms with the existence of disease. When subgingival plaques were analyzed by dark-field microscopy, spirochetes usually represented between 10 and 60% of the total bacterial count (3, 13–16, 28). Not only was there great variation in the distribution of spirochetes among individual patients but there was also significant intraindividual variation, with proportions ranging from 10 to 50% in different lesions of the same patient (8). Despite its ease and elegance, dark-field microscopy is not very useful for etiologic analyses since spirochetes cannot be specified by this method. In contrast, use of the predominant cultivable organisms approach allowed the biochemical identification and taxonomic characterization of bacteria growing in pure culture. Unfortunately, there was great discrepancy between the numbers of spirochetal morphotypes seen by dark-field microscopy and the rather small numbers of cultivable oral treponema species. In addition, depending on the culture conditions, the highest recoveries averaged about 1% of the total cultivable microbiota (17, 19, 27, 34). Although it may be biased to recognize not the etiologically relevant but merely the bacteria that are most easily cultured, the predominant cultivable organisms approach is still widely accepted. Furthermore, this approach does not distinguish between overgrowth of the opportunistic organisms that colonize niches created by the underlying disease and increases in the proportions of the true pathogens that cause periodontitis. Riviere and coworkers (23–26) applied immunofluorescence microscopy with monoclonal antibodies raised against *T. pallidum* to the detection of yet uncultured treponemes. They found tissue-invasive, so-called pathogen-related oral spirochetes (PROS), which occurred at a high frequency (23–26). However, we showed recently that PROS do not represent a single treponema species but rather represent a heterogeneous group of spirochetes clustering in the group I oral treponemes, of which *T. vincentii* is currently the only cultivable species (6). In the study presented here, yet uncultured group I isolates were found at a high frequency, but *T. vincentii* was found in only 9% of the samples, suggesting that most of the group I phylotypes and possibly PROS-positive treponemes have not been cultured so far. A discrepancy not as pronounced as that for *T. vincentii* and group I treponemes has been observed for *T. denticola* and group II spirochetes: *T. denticola* (29), which has often been found at frequencies of as high as 90% in other

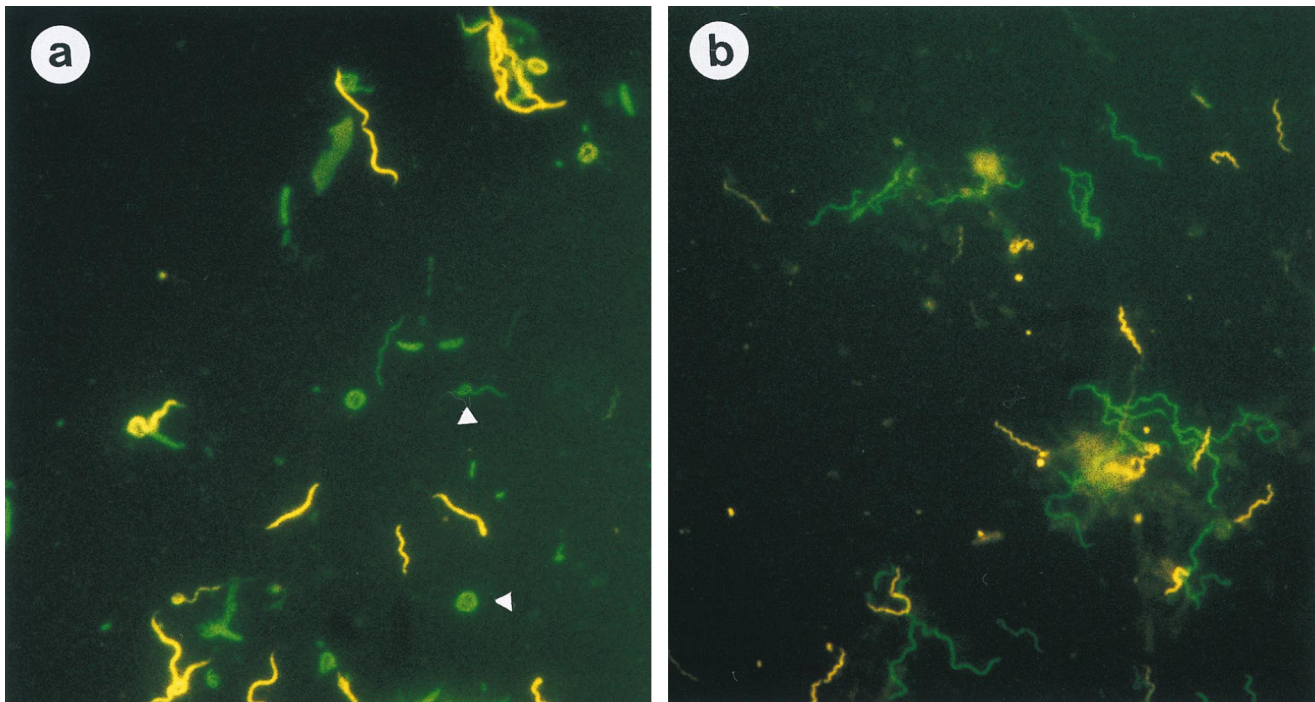


FIG. 3. Fluorescence in situ hybridization of subgingival plaque material from an RPP patient. (a) Microphotograph showing simultaneous hybridization with EUB338_{FITC} (green) and TRE I_{Cy3} (yellow). The eubacterial probe reveals the different morphotypes of subgingival plaque bacteria and the spherical bodies of the treponemes (arrows), as described by Wecke et al. (33). (b) Microphotograph showing hybridization with TRE I_{FITC} (green) and TRE II_{Cy3} (yellow). Note the different morphologies of the treponemes detected with the group-specific probes.

studies (27, 29), was detected in only 40% of the patient's specimens, but as yet uncultured group II treponemes were present in 72% of the patient's periodontal pockets. Group IV treponemes, including the novel species *T. maltophilum*, were found in each patient and 97.5% of all samples of subgingival plaque material. Positive hybridization signals with treponeme-specific probes in samples in which no spirochetes had been observed by dark-field microscopy are explained by the greater sensitivity of PCR amplification ($<10^2$ organisms/ml) compared to that of microscopy.

All treponemes described here predominated at diseased sites but were detected only infrequently at periodontally healthy sites, indicating that they indeed may be of etiologic relevance. However, whether the spirochetes found at control sites belong to the resident flora or originated from spillover periodontal lesion sulcus fluid carrying a high load of the respective treponemal phylotypes cannot be answered by the results of this study. It is intriguing to speculate that some of the treponemes found at healthy sites may later induce periodontal disease.

Highly sensitive molecular biology-based genetic methods may detect pathogenic microorganisms even in the absence of disease, thus questioning the specificity of the parasite-disease association demanded by Koch's postulates (10). Therefore, molecular geneticists, periodontists, and oral microbiologists have formulated guidelines for establishing causal relationships between microbes and disease (10, 30, 31). Large prospective molecular biology-based epidemiological studies that should also include so-called periodontitis-resistant populations (1, 22) will be required to unravel the etiology of periodontal disease.

In conclusion, sequence-based identification in combination with dot blot and in situ hybridization analyses provide strong

evidence for the causal role of treponemes in periodontal disease and may be of value in the development of new diagnostic and therapeutic strategies in order to potentially manage these ubiquitous and important infections.

ACKNOWLEDGMENTS

This study has been supported by a grant (01KI9318) from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (U.B.G.) and the Körber European Research Award (U.B.G.).

REFERENCES

1. Africa, C. W., J. R. Parker, and J. Reddy. 1985. Bacteriological studies of subgingival plaque in a periodontitis resistant population. I. Darkfield microscopic studies. *J. Periodontol. Res.* **20**:1-7.
2. Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919-1925.
3. Armitage, G. C., W. R. Dickinson, R. S. Jenderseck, S. M. Levine, and D. W. Chambers. 1982. Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J. Periodontol.* **53**:550-556.
4. Brosius, J., L. Palmer, J. P. Kennedy, and H. F. Noller. 1987. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4801-4805.
5. Choi, B. K., B. J. Paster, F. E. Dewhirst, and U. B. Göbel. 1994. Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect. Immun.* **62**:1889-1895.
6. Choi, B. K., C. Wyss, and U. B. Göbel. 1996. Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes (PROS). *J. Clin. Microbiol.* **34**:1922-1925.
7. Christerson, L. A., J. J. Zambon, and R. J. Genco. 1991. Dental bacterial plaques. Nature and role in periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **18**:441-446.
8. Evian, C. J., E. S. Rosenberg, and M. A. Listgarten. 1982. Bacterial variability within diseased periodontal sites. *J. Periodontol.* **53**:595-598.
9. Fiehn, N.-K. 1989. Small-sized oral spirochetes and periodontal disease. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **97**(Suppl. 7):1-31.
10. Fredricks, D. N., and D. A. Relman. 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:18-33.

11. Kornman, K. S. 1987. Nature of periodontal diseases: assessment and diagnosis. *J. Periodontol. Res.* **22**:192–204.
12. Lancet. 1991. Spirochetes in periodontal disease. *Lancet* **338**:1177–1178. (Editorial.)
13. Liljenberg, B., and J. Lindhe. 1980. Juvenile periodontitis. Some microbiological, histopathological and clinical characteristics. *J. Clin. Periodontol.* **7**:48–61.
14. Lindhe, J., B. Liljenberg, and M. A. Listgarten. 1980. Some microbiological and histopathological features of periodontal diseases in man. *J. Periodontol.* **51**:264–269.
15. Listgarten, M. A., and L. Hellden. 1978. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J. Clin. Periodontol.* **5**:115–132.
16. Listgarten, M. A., and S. Levin. 1981. Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration. *J. Clin. Periodontol.* **8**:122–138.
17. Loesche, W. J. 1988. The role of spirochetes in periodontal disease. *Adv. Dent. Res.* **2**:275–283.
18. Moore, W. E. C. 1987. Microbiology of periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* **22**:335–341.
19. Moore, W. E. C., E. V. Holdeman, S. M. Smibert, D. E. Hash, J. A. Burmeister, and R. R. Ranney. 1982. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect. Immun.* **38**:1137–1148.
20. Page, R. C., L. C. Altmann, J. L. Ebersole, G. E. Vandesteen, W. H. Dahlberg, B. L. Williams, and S. K. Osterberg. 1983. Rapidly progressive periodontitis. A distinct clinical condition. *J. Periodontol.* **54**:197–209.
21. Penn, C.-W. 1991. Pathogenicity and molecular biology of treponemes. *Rev. Med. Microbiol.* **2**:68–75.
22. Reddy, J., C. W. Africa, and J. R. Parker. 1986. Darkfield microscopy of subgingival plaque of an urban black population with poor oral hygiene. *J. Clin. Periodontol.* **13**:578–582.
23. Riviere, G. R., M. A. Wagoner, S. A. Baker-Zander, K. S. Weisz, D. F. Adams, L. Simonson, and S. A. Lukehart. 1991. Identification of spirochetes related to *Treponema pallidum* in necrotizing ulcerative gingivitis and chronic periodontitis. *N. Engl. J. Med.* **325**:539–543.
24. Riviere, G. R., K. S. Weisz, and D. F. Adams. 1991. Relative proportions of pathogen-related oral spirochetes (PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis. *J. Periodontol.* **63**:131–136.
25. Riviere, G. R., K. S. Weisz, D. F. Adams, and D. D. Thomas. 1991. Pathogen-related oral spirochetes from dental plaque are invasive. *Infect. Immun.* **59**:3377–3380.
26. Riviere, G. R., K. S. Weisz, L. G. Simonson, and S. A. Lukehart. 1991. Pathogen-related spirochetes identified within gingival tissue from patients with acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Infect. Immun.* **59**:2653–2657.
27. Salvador, S. L., S. A. Syed, and W. J. Loesche. 1987. Comparison of three dispersion procedures for quantitative recovery of cultivable species of subgingival spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* **25**:2230–2232.
28. Savitt, E. D., and S. S. Socransky. 1984. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J. Periodontol. Res.* **19**:111–123.
29. Simonson, L. G., C. H. Goodman, J. J. Bial, and H. E. Morton. 1988. Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infect. Immun.* **56**:726–728.
30. Socransky, S. S. 1977. Microbiology of periodontal disease—present status and future considerations. *J. Periodontol.* **48**:497–504.
31. Socransky, S. S., A. D. Haffajee, G. L. F. Smith, and J. L. Dzink. 1987. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* **14**:588–593.
32. Syed, S. A., and W. J. Loesche. 1972. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl. Microbiol.* **24**:638–644.
33. Wecke, J., V. Wolf, S. Fath, and J. P. Bernimoulin. 1995. The occurrence of treponemes and their spherical bodies on polytetrafluoroethylene membranes. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**:278–283.
34. Wyss, C., B. K. Choi, P. Schüpbach, B. Guggenheim, and U. B. Göbel. 1996. *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:745–752.

2.3.1.2. Zusammenfassung

Parodontitis ist der weltweit häufigste Grund für Zahnverlust. Die Ätiologie dieser chronischen Entzündung des Zahnhalteapparates ist bisher nur unzureichend geklärt, weil in dem subgingivalen Plaquematerial eine Vielzahl von Mikroorganismen nachgewiesen wurde. Durch kulturelle Verfahren konnten vorwiegend Anaerobier mit der Erkrankung assoziiert werden, welche als sogenannte ‚Oralpathogene‘ angesprochen werden. Allerdings zeigten sich bei der Untersuchung von subgingivalem Plaquematerial im Dunkelfeldmikroskop häufig spiralförmige Morphotypen, welche einen erheblichen Teil der Bakterienflora einzunehmen schienen. Dem gegenüber stand eine kleine Zahl bisher kultivierter oraler Treponemen, welche aufgrund ihrer anspruchsvollen Nährstoffbedingungen nur schwer anzuzüchten sind.

Um die Prävalenz dieser bisher vernachlässigten Mikroorganismen zu untersuchen, wurde eine molekularbiologische Epidemiologie oraler Treponemen durchgeführt. Hierfür wurden 244 subgingivale Plaqueproben von 53 bisher unbehandelten Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis untersucht. Nach Extraktion der gesamten DNA wurde eine PCR mit pan-bakteriellen Primern durchgeführt. Ein Teil der bakteriellen 16S rRNA-Gene wurde so amplifiziert und im Dot-Blot Format hybridisiert. Als Dot-Blot Sonden dienten 12 spezifische Oligonukleotide, welche anhand der Sequenzen aus einer 16S rRNA-Gen-Klonbank aus einem einzigen Plaquematerial entwickelt worden waren. Sie waren spezifisch für die 12 phylogenetischen Gruppen oraler Treponemen und für die fünf zu dem Zeitpunkt kultivierbaren Treponemen. Treponemen ließen sich in unterschiedlichen Kombinationen bei allen Patienten nachweisen. Ein Vergleich der Nachweisraten der kultivierbaren Spezies mit denen der phylogenetischen Gruppensonden ließ auf eine ausgesprochen hohe Prävalenz bisher nicht kultivierbarer Spezies schließen. Durch Einsatz der Oligonukleotidsonden in der FISH ließen sich diese bisher unbekanntes Spirochäten visualisieren. Dabei konnten durch Hybridisierung mit Sonden für verschiedene phylogenetische Gruppen auch morphologische Unterschiede festgestellt werden. Der Anteil an nicht kultivierten oralen Treponemen nahm bei einigen Proben mehr als die Hälfte der in der FISH dargestellten Bakterienpopulation ein.

Diese Studie war seinerzeit die erste, die beweisen konnte, dass bisher nicht kultivierte bakterielle Spezies in hoher Zahl in der menschlichen Mundhöhle vorkommen und die diese Bakterien auch mikroskopisch darstellen konnte. Obwohl sich durch diese reine Prävalenzstudie keine Rückschlüsse auf die Pathogenität der oralen Treponemen oder ihre Bedeutung für die Ätiologie der Parodontitis ziehen lassen, ermutigen die Ergebnisse zu weiteren Studien, um die Rolle der Spirochäten bei der Parodontitis zu untersuchen.

2.3.2. FISH für die Analyse oraler Biofilme

Orale Biofilme

Die subgingivale Plaque von Parodontitis-Patienten stellt einen komplexen mikrobiellen Biofilm mit einer aerob-anaeroben Mischflora, Pilzen und humanen Zellen dar. Sie enthält einen hohen Anteil bisher nicht kultivierter Bakterien, die bisher in der üblichen mikrobiellen Diagnostik vernachlässigt wurden. Es ist unklar, ob diese Bakterien die Parodontitis kausal verursachen, ob sie sie unterhalten, oder ob sie gar nur Nutznießer des veränderten mikrobiellen Milieus sind. Mittlerweile kann die Zahl der human oral besiedelnden Bakterienspezies zwar sequenzbasiert auf 700 geschätzt werden, doch sind weiterhin nur für eine kleine Zahl die molekularen Zusammenhänge der dentalen Biofilmbildung bekannt (109, 88, 1, 90). Kenntnisse zur Entstehung und Architektur subgingivaler Biofilme stammen zumeist aus Experimenten mit künstlichen Biofilmen. Mit Hilfe von Chemostaten, Tropfmodellen oder Durchflusskammern konnten bisher mono- und multispezies-Biofilme zur Nachbildung gebracht werden und ihre Architektur, die Adhäsion und das aktive Ablösen der Mikroorganismen im lebenden Biofilm mit einem konfokalen Laser-Mikroskop dargestellt werden (103, 110, 105). Diese Modelle haben den Vorteil standardisierter experimenteller Voraussetzungen und der Möglichkeit den Einfluss einzelner Parameter wie Kulturmedium, Flussgeschwindigkeit und Definition der beteiligten Bakterienspezies systematisch untersuchen zu können. Sie bergen jedoch auch eine Reihe systemischer Fehler. So arbeiten sie mit künstlichen Oberflächen und berücksichtigen nicht die Grenzfläche zwischen Biofilm und Wirt, welche mit Epithelzellen, pH-Wert, Sauerstoffdruck und Immunsystem die Ausbildung eines Biofilmes entscheidend mitbestimmen. Weiterhin enthalten sie nur einige kultivierbare Bakterienspezies und entsprechen nicht der natürlichen, hochkomplexen oralen Flora.

Koaggregation: Eine entscheidende Rolle in der Komposition des Biofilms spielen Mechanismen, die unter dem Begriff *Koaggregation* zusammengefasst werden. Einige Bakterien, die eine universelle Rezeptorenstelle für Keime anderer Arten besitzen, haben eine Schlüsselposition beim Aufbau eines Biofilms. Die Gruppe um Paul E. Kolenbrander geht davon aus, dass bei den oralen Biofilmen dem *Fusobacterium nucleatum* diese Schlüsselrolle zukommt (Abb. 8). Dieser Keim kann – so die Hypothese – das Bindeglied zwischen den früh- und den spätkolonisierenden Keimen innerhalb einer Plaquepopulation sein (57, 58).

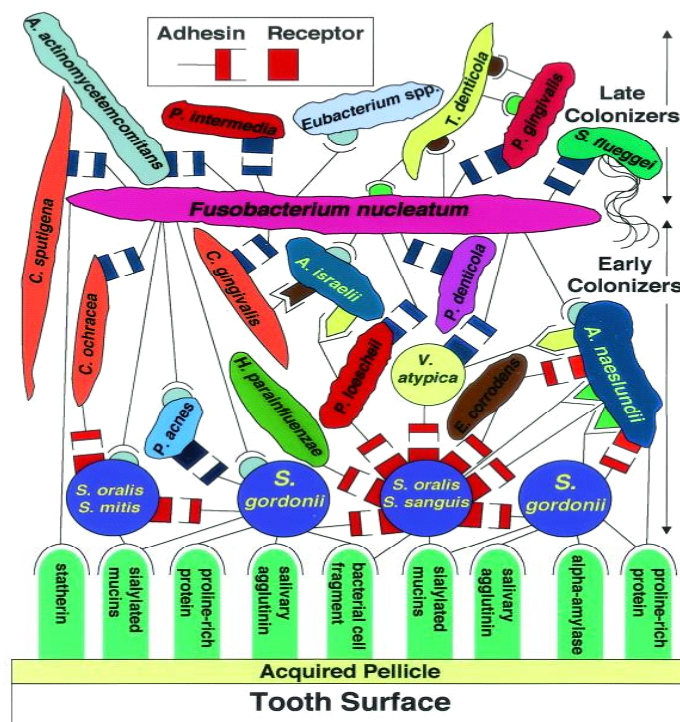


Abb. 8: Räumlich-zeitliches Modell zur Entstehung des subgingivalen Biofilms. (57)

FISH für die Analyse der Architektur subgingivaler Biofilme

Neben dem kultivierungsunabhängigen Nachweis von Bakterien interessieren demnach auch deren Anzahl und räumliche Verteilung sowie Interaktionen der Spezies untereinander. In der hier vorliegenden Arbeit wurde daher die Entnahme von intakten, humanen, subgingivalen Biofilmen mit Hilfe von kleinen Plastikträgern für elektronenmikroskopische Untersuchungen und FISH etabliert.

Patientenkollektiv: Zwölf Patienten mit bisher unbehandelter generalisiert aggressiver Parodontitis wurden in die Studie eingeschlossen. Keiner der Patienten hatte in den vergangenen sechs Monaten eine Antibiotikatherapie erhalten. Die untersuchten Zahntaschen hatten eine Tiefe von $8,07 \pm 1,63$ mm.

Gewinnung *in vivo* gewachsener subgingivaler Biofilme: Es wurden Träger aus Goldfolie und aus erweitertem Polytetrafluoroethylene (e-PTFE) hergestellt. Für letztere wurde die dünne e-PTFE Membran um einen Plastikstift oder alternativ Dentinstift gelegt und an vier Punkten mit ihm verklebt. An einer Seite überragte die Membran den Stift. Diese Träger wurden derart in Zahntaschen der Patienten eingebracht, dass das längere Membranstück der Zahnseite, das kurze Membranstück der Gingivaseite zugewandt war. So konnte der überragende Membranteil mit Acrylkleber am Zahn befestigt werden, was nach Entnahme der Träger für die Einbettung eine exakte Orientierung erlaubte.

In dieser Position wurden die Träger für drei oder fünf Tage belassen, um die Ausbildung eines subgingivalen Biofilmes zu erlauben. Danach wurden die Träger entnommen und entweder für die Elektronenmikroskopie oder die FISH fixiert und eingebettet.

Ultrastruktur der subgingivalen Plaque: Die Biofilmbildung auf den Trägern wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie (SEM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Beide Trägermaterialien, Gold und e-PTFE waren gleichermaßen geeignet für die Elektronenmikroskopie und zeigten auch bei den Ergebnissen zur Biofilmbildung keine Unterschiede. Nach drei Tagen Verweildauer in der Parodontaltasche waren im SEM einzelne Biofilm-Inseln nachweisbar, die sich im TEM als locker strukturierter Biofilm auf einem dichten homogenen Pellicel darstellten. Dabei fanden sich in der Tiefe der Zahntasche vermehrt Spirochäten und Gram-negative Stäbchen, während sich in den superfiziellen Regionen eher Gram-positive Kokken zeigten. Nach sechs Tagen Verweildauer in der Zahntasche zeigten sich durchgehend reife, dichte Biofilme mit massiver Kolonisierung von Treponemen.

FISH-Analyse der subgingivalen Plaque: Eine exakte Speziesidentifikation der Bakterien im subgingivalen Biofilm war nur mit Hilfe der FISH möglich. Allerdings ließen sich hierbei nur die Träger mit e-PTFE Membran auswerten, da sowohl Gold, als auch Dentin zu hohe Reflektionen im Fluoreszenzmikroskop verursachten. Die mit dem Rotationsmikrotom angefertigten Schnitte erlaubten jedoch die FISH-Analyse des Biofilm-Querschnittes bei exakter Orientierung im Präparat. Der sechs Tage alte Biofilm wies eine Dicke von bis zu 45 µm auf und zeigte mit der bakteriellen Sonde einen außerordentlichen morphologischen Artenreichtum. Hybridisierung mit spezifischen Sonden machte einen komplexen und hochorganisierten Aufbau deutlich (Abb. 9). So zeigte sich, dass ein großer Teil der in der EM dargestellten Spirochäten zu den Treponemen der Gruppe I gehörten, von denen die meisten Phylotypen bisher nicht kultiviert sind, und ein dichtes Netzwerk bildeten (Abb.10). Weiterhin zeigte sich

eine komplexe Biofilm-Architektur, an der auch zahlreiche andere sogenannte Oralpathogene beteiligt sind (Abb. 11).

geschützt

Abb. 9: FISH eines subgingivalen Biofilms.
Grün: *Bacteria*, Gelb: *Streptococcus* spp.,
Blau: DAPI. (Balken 10 µm)

Abb.10: FISH eines subgingivalen Biofilms.
Grün: *Bacteria*, orange: Treponemen der
Magenta: *Fusobacterium nucleatum/canifelinum*, phylogenetischen Gruppe I. (Balken 10µm)

geschützt

Abb. 11: FISH eines subgingivalen Biofilms. Grün: *Bacteria*, Blau: DAPI, Gelb: *Tannerella forsythia*, Magenta: *Porphyromonas gingivalis*

Somit konnte eine Technik entwickelt werden, die es ermöglicht *in vivo* gewachsene orale Biofilme zu untersuchen. Bekannte orale Spezies sowie bisher nicht kultivierte

Spezies konnten in großen Zahlen nachgewiesen werden und ihre räumliche Beziehung zueinander bestimmt werden. Zuvor durch Elektronenmikroskopie beschriebene Biofilm-Formationen, sogenannte ‚Maiskolbenstrukturen‘ oder ‚Reagenzglasbürsten‘ konnten in den Biofilmen mit der FISH dargestellt werden, die beteiligten Spezies identifiziert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die von Kolenbrander beschriebenen Koaggregationsphänomene tatsächlich *in vivo* existieren.

A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets

Jörg Wecke ^{a,*}, Thomas Kersten ^a, Kasimierz Madela ^a, Annette Moter ^b,
Ulf B. Göbel ^b, Anton Friedmann ^c, Jean-Pierre Bernimoulin ^c

^a Robert Koch-Institut, Nordufer 20, D-13353 Berlin, Germany

^b Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Humboldt Universität zu Berlin, Dorotheenstraße 96, 10117 Berlin, Germany

^c Abteilung Parodontologie, Zentrum für Zahnmedizin der Charité, Humboldt Universität zu Berlin, Föhrer Straße 15, 13353 Berlin, Germany

Received 24 May 2000; received in revised form 25 July 2000; accepted 2 August 2000

Abstract

A new technique is presented for analyzing subgingival bacterial plaque. Different materials (polytetrafluoroethylene, gold, dentin) kept for several days in periodontal pockets of patients suffering from periodontitis were analyzed by electron microscopy and fluorescence in situ hybridization (FISH). Those parts of the carriers extending into the deepest zone of the pockets were predominantly colonized by spirochetes and Gram-negative bacteria whereas those segments in contact with a shallower region were colonized by streptococci. Independent of the material used, the bacterial colonization of the carriers appears to be similar. FISH using eubacteria- and species-specific oligonucleotides on semi-thin cross-sections of the carriers in combination with confocal laser scanning microscopy allowed detailed analysis of the architecture of biofilms and identification of putative periodontal pathogens with single cell resolution. © 2000 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Periodontal pocket; Subgingival plaque; Biofilm; Ultrastructure; Fluorescence in situ hybridization

Copyright
beim
Verlag

* Corresponding author. Tel.: +49 (30) 45-47-22-19;
Fax: +49 (30) 45-47-26-06; E-mail: hanc@rki.de

2.3.2.2. Zusammenfassung

Der subgingivale Biofilm ist ein komplexes Netzwerk einer aerob-anaeroben Mischflora. Ein großer Teil der bakteriellen Spezies ist bisher nicht kultiviert. Daher sind alle *in vitro* Modelle des oralen Biofilms bislang unbefriedigend. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Technik entwickelt, um *in vivo* gewachsenen Biofilm zu gewinnen. Hierfür wurden Träger aus Gold oder e-PTFE-Membranen in Parodontaltaschen von Parodontitispatienten inseriert. Nachdem die Träger drei oder sechs Tage in den Zahntaschen verblieben waren, wurden sie entnommen und mittels Elektronenmikroskopie und FISH untersucht. Es zeigte sich, dass nach drei Tagen ein homogenes Pellicel von einzelnen mikrobiellen Biofilm-Inseln besiedelt war. Nach sechs Tagen stellte sich ein reicher, homogener Biofilm dar. Elektronenmikroskopisch konnten in den apikalen Bereichen des Biofilms ein dichtes Netzwerk von Spirochäten und Gram-negativen Mikroorganismen gezeigt werden, während sich in den Bereichen des Zahntaschenausganges vermehrt Gram-positive Kokken befanden. Mit der FISH war es möglich, individuelle Bakterienspezies darzustellen. Es zeigte sich eine komplexe und hochorganisierte Architektur, an der unter anderem zahlreiche bisher nicht kultivierte Treponemen beteiligt waren. Diese Technik ermöglichte zum ersten Mal einen umfassenden Einblick in die Zusammensetzung und den Aufbau *in vivo* gewachsener humaner Biofilme.

2.3.2.3. Ausblick

Die vorgestellte Technik erlaubt nun mit Hilfe von digitaler Bildverarbeitung, die Architektur subgingivaler Biofilme und das Zusammenspiel der oralen Spezies zu analysieren. Um zu untersuchen, ob die von Kolenbrander beschriebenen Koaggregationsphänomene tatsächlich *in vivo* zur Ausprägung kommen, wurde die digitale Bildauswertung mit der *daime*-Software (22, 23) für das Trägermodell etabliert (Abb. 12). Diese Software bietet neben der Quantifizierung und 3-dimensionalen Bilddarstellung auch die Möglichkeit, Kollokalisierung oder Abstoßung zweier Spezies zu berechnen und so Biofilmarchitektur objektivierbar zu beschreiben. Vorläufige Ergebnisse weisen auf Kollokalisierung zwischen Fusobakterien und *Tannerella forsythia* hin, was die Hypothese von Kolenbrander et al. unterstützt (Abb. 12).

geschützt

Abb. 12A: FISH eines subgingivalen Biofilms mit pan-bakterieller Sonde und spezifischen Sonden für *T. forsythia* und *Fusobacterium* spp.. Beide Spezies scheinen im linken Drittes des Biofilms zu kolokalisieren. Abb. 12B: Die Paar-Korrelationskurve unter Verwendung von daime zeigt ein Maximum bei 5µm, was für eine Kolokalisation beider Spezies in dieser Distanz spricht.

Diese vorläufigen Daten ermutigen zur digitalen Bildanalyse weiterer oralpathogener Spezies. Die beschriebenen subgingivalen Zahntaschenträger bleiben jedoch weiterhin nur ein Modell für die Biofilmanalyse der Parodontitis. Eine entscheidende Einflussgröße stellt das Immunsystem des Wirtsorganismus dar, das in Interaktion mit dem multimikrobiellen Geschehen steht. Durch die Etablierung der FISH an histologischen Gewebsschnitten besteht die Möglichkeit, die Biofilm-Wirt Interaktion *in situ* zu beobachten. Erste Untersuchungen an Gingiva-Biopsien von Parodontitis-Patienten bieten Hinweise, dass sich die Ergebnisse des Zahntaschenträgermodells im Gewebe tatsächlich bestätigen. Hier zeigten erste FISH-Analysen, dass Treponemen tatsächlich in der Lage sind *in vivo* an humane Zellen zu adhären, was ein Hinweis auf eine Invasivität und somit Rolle bei der Pathogenese der Parodontitis sein kann (Abb. 13).

geschützt

Abb. 13: FISH am Schnitt einer Gingivabiopsie eines Parodontitis-Patienten. Die Treponemen (gelb) adhäreren an die Gewebezellen (grün mit blauem Zellkern).

So erlaubt die FISH an Gewebsschnitten eine Analyse der Bakterien-Wirt Interaktion wie im folgenden Kapitel beschrieben.

2.3.3. FISH für die Analyse von Biofilm-Wirt Interaktionen am Beispiel der Dermatitis digitalis

Während die reine Prävalenz die Pathogenität eines Mikroorganismus noch nicht beweist, kann seine Visualisierung in Gewebsschnitten wichtige Indizien für seine Invasivität liefern. Um die Rolle der Treponemen bei der Entwicklung von chronischen Entzündungen zu untersuchen, wurde ihre Verteilung im Biofilm und an der Biofilm-Gewebsgrenze bei der Rinderklauenseuche Dermatitis digitalis analysiert.



Abb. 14: Von Dermatitis digitalis befallene Rinderklaue

Dermatitis digitalis

Bei der Dermatitis digitalis (DD) handelt es sich um eine bakterielle Klauenseuche des Rindes. Obwohl sie bereits 1974 von Cheli und Mortellaro beschrieben wurde, ist ihre Ätiologie weitgehend ungeklärt (17). Die Erkrankung ist charakterisiert durch große ulzerierende oder papillomatöse Läsionen an den Klauen, welche mit einem artenreichen bakteriellen Biofilm besiedelt sind (Abb. 14). Aus mikrobiologischer Sicht hat die DD viele Gemeinsamkeiten mit der humanen Parodontitis. So ist sie ebenfalls eine chronisch-destruierende, schwer zu behandelnde Infektionskrankheit, welche mit einer aerob/anaeroben Mischflora assoziiert ist. Häufig sind ganze Ställe und Betriebe gerade in Brandenburg, aber auch in den USA und Großbritannien betroffen. Da die DD bei den Rindern zu Infertilität und reduzierter Milchproduktion führt, stellt sie zudem einen wichtigen wirtschaftlichen Faktor für Landwirte dar (7, 15).

Mikrobiologie der Dermatitis digitalis: Mikroskopische Analyse von Tupfpräparaten aus DD-Läsionen zeigten regelmäßig eine bakterielle Mischflora mit einem großen Anteil an Spirochäten (7, 42). Hinweise auf eine Gewebsinvasivität der Spirochäten gaben histologische Untersuchungen mit der Warthin-Starry oder Silberfärbung. Auch elektronenmikroskopisch wurden Spirochäten zwischen oder in nekrotischen Zellen des Stratum corneum und Stratum granulosum festgestellt (42).

Wie auch bei der Parodontitis gab es jedoch Probleme bei der Kultivierung und Identifikation dieser Spirochäten. Daher wählten Choi et al. wiederum einen molekularbiologischen Zugang, indem sie aus DD-Biopsien eine Klonbank der 16S

rRNA-Gene der Spirochäten erstellten (18). Es zeigte sich eine Vielfalt von Treponemen-Phylotypen, welche größtenteils nah verwandt mit den humanen oralen Treponemen waren. Ziel der vorliegenden Studie war es, mittels FISH die Beteiligung der Treponemen an der Ätiologie der DD zu untersuchen.

Probennahme: Aus dem Ulkusgrund von 10 Rinderklauen, die an DD erkrankt waren, wurden Biopsien (1x1 cm) entnommen. Die Proben wurden wie beschrieben in Methacrylat eingebettet.

Oligonukleotidsonden

Durch die nahe Verwandtschaft der DD Treponemen mit denen der humanen Mundhöhle, konnten die zuvor beschriebenen Gruppensonden für die phylogenetischen Gruppen I, II und IV auch für die Darstellung der Treponemen bei der DD genutzt werden. Dazu wurde zusätzlich die Sonde DDK4 benutzt, die aus der oben erwähnten Klonbank der Rinderklauenprobe abgeleitet wurde. Die bakterielle Sonde EUB338 diente zur Darstellung der gesamten Bakterienflora.

Gewebsinvasion von Treponemen

Hybridisierung mit der bakteriellen Sonde EUB338 zeigte einen breiten, dichten Biofilm auf der Außenfläche des Ulcus, der mit autofluoreszierenden Erythrozyten und Detritus gemischt war und vielfältige bakterielle Morphotypen enthielt. FISH mit der Sonde DDK4 ließ massenhaft Treponemen erkennen, die sich vor allem im Bereich der Grenzfläche zum Gewebe ansammelten. Bei höherer Auflösung konnten die Treponemen in den Zellzwischenräumen im Gewebe dargestellt werden. Durch FISH mit den verschiedenen spezifischen Sonden war eine Kartierung der Treponemen-Phylotypen im Gewebe möglich. So fanden sich die *T. denticola* ähnlichen Gruppe II Treponemen eher in den Außenbereichen, während Gruppe I, VI und DDK4-Treponemen tief in das Gewebe bis ins Stratum spinosum einwanderten. Am weitesten in das Gewebe drang ein dünner, länglicher Morphotyp ein, der sich nur mit der bakteriellen Sonde darstellen ließ. In späteren Untersuchungen konnte durch Dekonvolution von Z-Bildstapeln die spiralförmige Morphologie dieses ‚Vorreiters‘ dargestellt werden (Abb. 15).

geschützt



Abb. 15: FISH eines Gewebsschnittes eines DD-Ulkus. Von der Oberfläche (links außerhalb des Bildausschnittes) dringen Bakterien (orange) tief in das Gewebe ein (rechts). Mit DAPI gefärbte Zellkerne stellen sich blau dar). Nach Dekonvolution (quadratischer Ausschnitt) werden an der vordersten Front Spirochäten sichtbar. (Balken 10 µm)

Durch diese Studie konnte die Gewebeinvasivität der bisher nicht kultivierten Treponemen für die Dermatitis digitalis belegt werden. Da es sich bei den oralen Treponemen des Menschen um phylogenetisch nahe Verwandte handelt, liegt die Vermutung nahe, dass Treponemen auch bei der Parodontitis entscheidend zum Entzündungsgeschehen beitragen. Interessanterweise wird bei der Parodontitis *T. denticola* als ‚oralpathogen‘ angesprochen. Der Grund hierfür liegt jedoch eher darin, dass *T. denticola* leichter kultivierbar ist und demnach häufiger bei Parodontitispatienten nachgewiesen wurde. Aber weder bei unseren molekularepidemiologischen Untersuchung der Parodontitis, noch bei der Gewebeinvasion der Dermatitis digitalis schienen *T. denticola* oder ihre phylogenetischen Verwandten die entscheidende Rolle zu spielen.

Fluorescence *in situ* hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions

Annette Moter,¹ Gregor Leist,² Roland Rudolph,² Kirstin Schrank,³ Bong-Kyu Choi,⁴ Michael Wagner⁵ and Ulf B. Göbel¹

Author for correspondence: Ulf B. Göbel. Tel: +49 30 2093 4715. Fax: +49 30 2093 4703.
e-mail: goebel@rz.charite.hu-berlin.de

¹ Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, Dorotheenstr. 96, D-10117 Berlin, Germany

² Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin, Straße 518, Nr. 15, D-14163 Berlin, Germany

³ Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin, Luisenstr. 56, D-10117 Berlin, Germany

⁴ Department of Oral Biology, Yonsei University, 134 Shinchon-Dong, 120-752 Seoul, Korea

⁵ Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Arcisstr. 16, D-80290 München, Germany

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed on sections of plastic-embedded tissue using 16S rRNA-directed oligonucleotide probes to visualize uncultured treponemes in skin biopsies of cows with digital dermatitis. Plastic as embedding material allowed sectioning of hard and soft tissue with a defined thickness, avoiding the risk of dragging bacteria into the tissue while sectioning. Furthermore, it provided a good signal-to-noise ratio. Using this method the spatial distribution of three different bacterial phylotypes was visualized simultaneously within the tissue. Whereas debris covering the ulcers contained a mixture of different micro-organisms, a layering of certain treponemal phylotypes was observed deeper in the epidermis. Confocal laser scanning microscopy and subsequent three-dimensional reconstruction of series of optical sections confirmed that the treponemes migrated intercellularly around the cells, most of them directed towards the dermis. *In situ* hybridization on tissue embedded in plastic proved to be a useful method to study mixed bacterial infections since it combines excellent histological conservation of tissue with identification of bacterial species by simultaneous use of probes labelled with different fluorescent dyes. This technique may have implications for *in situ* detection, identification and localization of micro-organisms in veterinary as well as in human medicine.

Keywords: treponemes, tissue sections, *in situ* hybridization, FISH

INTRODUCTION

In situ hybridization (ISH) has been proven to be a useful method for detection and identification of bacteria within their natural environments. It has been used to visualize uncultured micro-organisms to estimate their size, number and morphology (Amann *et al.*, 1991; DeLong *et al.*, 1989). Recently, it was applied to identify spirochaetes from digital dermatitis (DD) lesions in cattle (Choi *et al.*, 1997). DD, first described by Cheli & Mortellaro (1974), is an ulcerative epidermitis typically found at the plantar skin proximal to the heel bulbs of

dairy cows and beef cattle. Clinically, it is characterized by wet, exudative and typically malodorous lesions with pain and swelling at the diseased site. DD causes substantial economic losses worldwide (Blowey & Sharp, 1988; Weaver *et al.*, 1993) due to lameness, reduced fertility and significant decrease in body weight and milk production.

Microscopic analysis of touch preparations of DD lesions typically shows spirochaetes as the predominant morphotype, suggesting a possible aetiological role for these organisms (Blowey *et al.*, 1992; Done *et al.*, 1993; Read *et al.*, 1992). Recently, comparative 16S rDNA analysis showed that these as yet unclassified DD spirochaetes are closely related to cultivable as well as to uncultured oral treponemes (Choi *et al.*, 1997). Using 16S rRNA-directed oligonucleotide probes in ISH of

Abbreviations: DD, digital dermatitis; CLSM, confocal laser scanning microscopy; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; H&E, haematoxylin/eosin; ISH, *in situ* hybridization.

touch preparations, *Treponema denticola*-like spirochaetes were detected in the highest proportions among all treponemal species. However, it is not clear whether these organisms are simply commensals proliferating in the anaerobic milieu of a skin ulcer or actively involved in primary inflammation. Using Warthin–Starry (Blowey *et al.*, 1994) or silver staining (Elias & Bosma, 1987), DD spirochaetes have been detected within tissue sections. Light and transmission electron microscopy have indeed shown numerous spirochaetes between or inside necrotic cells within the stratum corneum and stratum granulosum, but again species identification was not possible by these methods.

The specific aim of this study was to identify treponemes directly within the epidermis and to visualize their spatial distribution using fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

METHODS

Bacterial strains. The following bacterial strains were used as controls to optimize the ISH conditions: *Treponema vincentii* (ATCC 33580 and RITZ A), *Treponema denticola* (ATCC 33521), *Treponema pectinovorum* (ATCC 33768), *Treponema socranskii* subsp. *buccale* (ATCC 35534), *Treponema socranskii* subsp. *socranskii* (ATCC 35536), *Treponema maltophilum* (Wyss *et al.*, 1996) and *Treponema phagedenis* subsp. *reiteri* (kindly provided by B. Wilske, Munich, Germany).

Processing of tissue specimens. Biopsies (1 × 1 cm) were taken from typical DD lesions of 10 infected dairy cows from 10 different farms (Land Brandenburg, Germany) and transported to the laboratory immediately. All of the following steps were performed at a temperature of 4 °C. The tissue was cut into slices with a maximum thickness of 0.3 cm and fixed with 3.7% (v/v) formaldehyde in PBS (pH 7.4) for at least 3 h. The embedding procedure, utilizing cold polymerizing resin (Technovit 8100, Kulzer), was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, the specimens were washed overnight in PBS containing 6.8% (w/v) sucrose, dehydrated in acetone for 1 h and infiltrated with the plastic solution (Technovit 8100 base-liquid with hardener I) for at least 6 h. After adding hardener II, the biopsies were aligned properly in the wells of histoform S (Kulzer), sealed with cover foil and placed in the refrigerator. After polymerization, histoblocks were mounted on the specimen using Technovit 3040. The blocks were stored at 4 °C prior to sectioning. Formaldehyde-fixed biopsies were routinely embedded in

paraffin in parallel. After dehydration in a graded alcohol series, they were transferred to paraffin via xylene and embedded in tissue-tec moulds (Kulzer).

Sectioning and light microscopy. Blocks were sectioned on a rotary microtome (Medim, Type DDM 0036) using steel knives with hard metal edges. Tissue sections (4 µm) were straightened on sterile water, placed on silanized slides (Super Frost, Medim; 3-aminopropyltrimethoxysilane, Sigma) and stored at 4 °C.

For histological evaluation, tissue sections were stained with haematoxylin/eosin (H&E) and examined using an Axioskop microscope (Zeiss).

Oligonucleotide probes. Phylotype-specific oligonucleotide probe DDK4 (Table 1), corresponding to position 1246–1267 in *Escherichia coli* 16S rRNA, was designed to be complementary to the sequence of a clone derived from a 16S rDNA gene library of DD spirochaetes reported previously (Choi *et al.*, 1997). Group-specific probes TRE I, II and IV (Table 1) were designed after comparative sequence analysis of clones from a 16S rDNA library representing cultivable and as yet uncultured oral treponemes associated with periodontal disease (Choi *et al.*, 1994; Moter *et al.*, 1998). To assess specificity, probe sequences were compared with those of all 16S rRNA entries in the EMBL and GenBank databases (July 1997) using the Husar program package (DKFZ, Heidelberg, Germany). In addition, all oligonucleotide probes were tested by dot-blot hybridizations against PCR-amplified 16S rDNA from 34 bacteria. These controls included sequences from clones of a gene bank of uncultured oral treponemes derived from a 16S rDNA library, cultivable *Treponema* species and oral pathogens as described previously (Moter *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1997). Cultivable representatives of these spirochaetal groups targeted by probes TRE I, II, IV and DDK4 are *T. vincentii*, *T. denticola*, *T. maltophilum* and *T. phagedenis*, respectively (Table 1). EUB 338 (5' GCTGCCTCCCGTAGGAGT), specific for the domain *Bacteria*, was used to visualize the entire bacterial population in the specimens (Amann *et al.*, 1990). End-labelling (3') of oligonucleotide probes with Cy3-dCTP or Cy5-dCTP [5-aminopropargyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate coupled to Cy3 (indocarbocyanine) or Cy5 fluorescent dye, Amersham] was performed enzymically using terminal transferase (Boehringer Mannheim). Fluorescein-labelled (5') probes were obtained from Tib Molbiol (Berlin).

FISH. Hybridization buffer contained 0.9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.3, and 0.01% SDS. The stringency was adjusted by varying the formamide concentration from 0 to 30% (v/v) depending on the oligonucleotide probe used. To assess specificity of the probes, all available *Treponema* strains served as controls, using fixed cells (Moter *et al.*, 1998) or

Table 1. Treponeme-specific oligonucleotide probes used for FISH

Phylogenetic group of oral treponemes	Oligonucleotide probe	Sequence (5' → 3')	Reference	Cultivable representative
I	TRE I	ACGCAAGCTCATCCTCAAG	Choi <i>et al.</i> (1997)	<i>T. vincentii</i>
II	TRE II	GCTCCTTTCTCATTTACCTTTAT	Moter <i>et al.</i> (1998)	<i>T. denticola</i>
IV	TRE IV	CGGTCACATTCGGTATTACCTACT	Moter <i>et al.</i> (1998)	<i>T. maltophilum</i>
–	DDK4	ACAGTCTCGCTTCACTTTGTAG	Choi <i>et al.</i> (1997)	<i>T. phagedenis</i>

sections of plastic-embedded cultures. Control slides with fixed treponeme cultures were included in every hybridization experiment with tissue sections. Of all 10 biopsies, at least three sections were investigated in three different hybridization experiments. Pre-warmed hybridization solution (20 µl) was mixed with approximately 5 pmol of the appropriate oligonucleotide probe and carefully applied to the tissue sections. After incubation for 3.5 h in a dark humid chamber at 46 °C, slides were washed with pre-warmed buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.01% SDS) for 15 min at 46 °C. The NaCl concentration was adjusted from 0.112 to 0.45 M, according to the formamide concentration in the hybridization solution. Slides were then rinsed with distilled water, air-dried in the dark and mounted with Citifluor AF 1 (Chemical laboratory of the University of Kent). Paraffin sections were dewaxed in xylene for 15 min and rehydrated in 96, 70 and 50% (v/v) ethanol (5 min each) prior to hybridization.

Epifluorescent microscopy and CLSM. A Zeiss Axioskop epifluorescence microscope was used to view the bacteria in sections processed for FISH. The microscope was equipped with a 50 W high pressure mercury lamp (HBO50, Osram) and 10×, 40× and 100× objectives (Zeiss). Narrow band Filter sets HQ-F41-007 and HQ-F41-001 (AHF) were used to analyse FITC and Cy3 signals, respectively. Photomicrographs were taken on Kodak Ektachrome HC 400 film. A Zeiss LSM 410 scanning confocal microscope equipped with an Ar-ion laser (488 nm) and two HeNe lasers (543 and 633 nm) was used to record optical sections. Image processing was performed with a standard software package delivered with the instrument (Zeiss LSM version 3.95). Reconstructed and processed images were reproduced on slide film (Kodak Professional, HC 100).

RESULTS

Histology of DD lesions

H&E staining of the skin sections revealed signs of acute inflammation with a highly hyperplastic epidermis and pronounced rete-ridge formation. The corneal, granulosal and superficial spinosal cell layers were eroded and the tips of the dermal papillae were ulcerated (Fig. 1a). Erythrocytes, leukocytes and debris of destroyed keratinocytes were mixed with particulate material and micro-organisms, and covered the lesion as a crust.

Embedding procedure and hybridization conditions

Skin biopsies were embedded into the cold polymerizing resin Technovit 8100. The entire procedure required 2 d, but only 1 h of actual laboratory work. Biopsies up to 10 × 5 × 3 mm could be processed easily. Sectioning of soft and hard tissue was equally feasible with exactly defined thickness ranging from 1 to 30 µm. Conditions for conventional FISH protocols for touch preparations were easily adapted to tissue FISH. Stringent hybridization conditions were determined for each probe using sections of plastic-embedded or fixed treponeme cultures (data not shown). Optimal

hybridization stringency was achieved by adding formamide to the hybridization buffer: 10% final concentration for TRE I and IV, 20% for TRE II and DDK4. However, as no significant reduction in signal intensity for TRE I and IV was observed using 20% formamide, all hybridizations were performed at this concentration. Resin sections did not require any further treatment, such as etching or dehydration, before applying the hybridization solution. When silanized slides were used, there was no need for coverslips or sealing of the samples because the hybridization solution remained on the plastic sections without floating off the slide. Tissue sections could be stored for up to 6 months without any significant signal reduction. After hybridization, the slides could be examined within 1 week. The preparations were analysed equally well by epifluorescent microscopy and confocal laser scanning microscopy (CLSM). However, epifluorescence microscopy allowed a better orientation within the tissue, whereas CLSM allowed three-dimensional reconstruction (data not shown) and exact localization of the micro-organisms outside the cells.

Direct visualization of bacteria by FISH

To identify tissue-invasive treponemes possibly involved in the pathogenesis of disease, the spatial distribution of spirochaetes within the epidermis of DD ulcers was investigated using FISH on sections of tissue embedded in the cold polymerizing resin Technovit 8100. Excellent morphological resolution provided exact histological orientation within the tissue. A high signal-to-noise ratio and the slight autofluorescent background allowed location of bacteria within the epidermis. From all 10 biopsies, three sections each were used in independent experiments. Hybridization with EUB 338 showed a variety of different bacterial morphotypes mixed with autofluorescent erythrocytes in the debris covering the ulcer. Simultaneous hybridization with probe DDK4 revealed large numbers of spirochaetes in this area. While most of the EUB 338-stained bacteria were visible in the debris on the surface of the ulcer, the majority of treponemes were located within the tissue (Fig. 1b). Focusing on the spinosal cell layers of the epidermis, DDK4-positive bacteria appeared to be in bundles around the cells and directed towards the dermis. No spiral-shaped and long stretched bacteria were visualized in this region using EUB 338 (Fig. 1c). CLSM confirmed that the treponemes were indeed located around the cells (Fig. 1d), whereas no bacteria were visible within cells.

Three biopsies were further analysed by using different combinations of specific oligonucleotide probes simultaneously, revealing a stratification of different treponemal phlotypes within the epidermis (Fig. 2). Group II treponemes (*T. denticola*-related) were only detected in the very superficial layers (Fig. 2b), whereas TRE IV- (data not shown), TRE I- and DDK4-positive

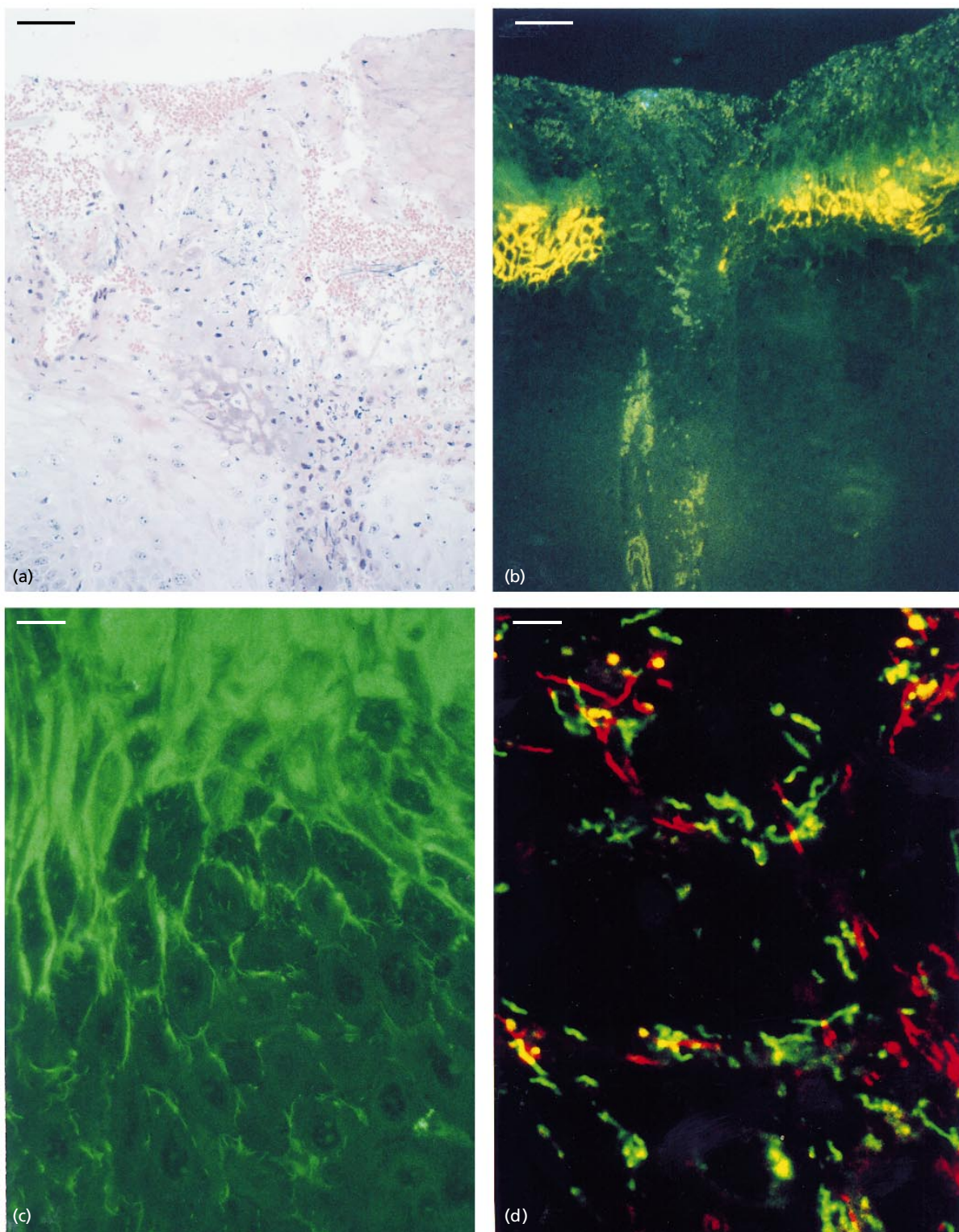


Fig. 1. For legend see facing page.

treponemes migrated deep into the stratum spinosum (Fig. 1e). Using EUB 338, an additional distinct morpho-type of long stretched bacteria, not detectable with any of the other probes used here, was visualized deep in the epidermis next to the dermal papillae.

The same FISH protocol used on paraffin sections did not give satisfactory results. The bacteria appeared rather hazy and hard to distinguish in the high background of non-specifically stained material (data not shown).

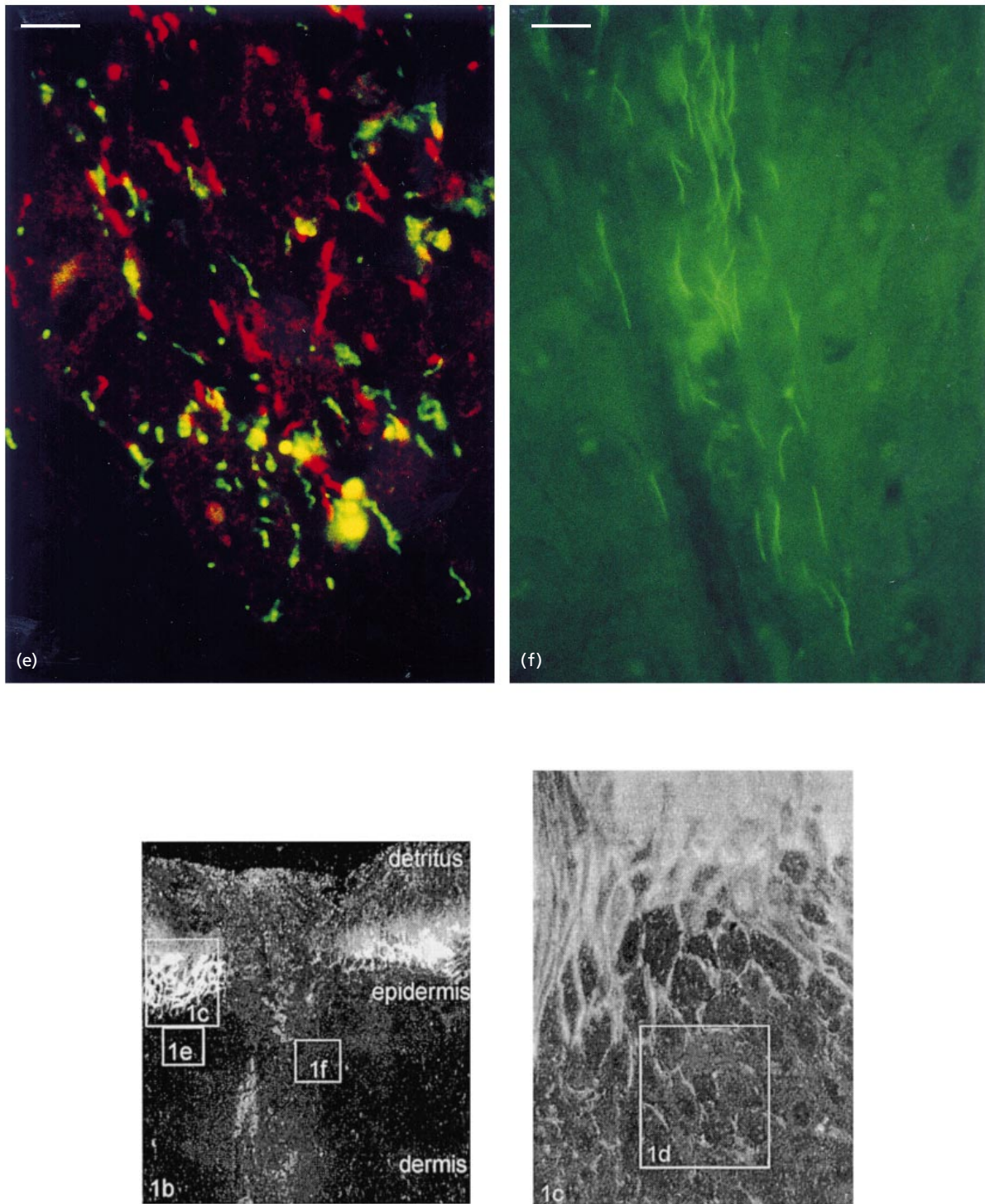


Fig. 1. Histopathology and FISH of tissue sections from DD lesions. (a) H&E staining showing typical histology with necrotic superficial epidermal layers. Bar, 50 μm . (b) FISH of the same area using universal probe EUB 338_{FITC} (green) and DDK 4_{Cy3} (yellow) exhibits stratification of fluorescence signals, localizing EUB 338-positive bacteria predominantly in the debris and DDK4-positive treponemes in the stratum corneum and stratum spinosum. Bar, 50 μm . (c) Using the FITC filter set, no rods or cocci were detected by EUB 338. In the upper part of the micrograph large numbers of micro-organisms are visible. Bar, 10 μm . (d, e) Deeper in the tissue single spirochaetes are visible between cells directed towards the dermis. CLSM of simultaneous hybridization with TRE 1_{Cy5} (green) and DDK 4_{Cy3} (red) shows both phylotypes migrating around the cells deep (d) and even deeper (e) within the tissue (e). Bars, 5 μm . (f) EUB 338-stained bacteria migrating deepest into the tissue are visible close to a dermal papilla. Bar, 5 μm . The diagram below (e) and (f) shows the relationship between the various parts of the figure.

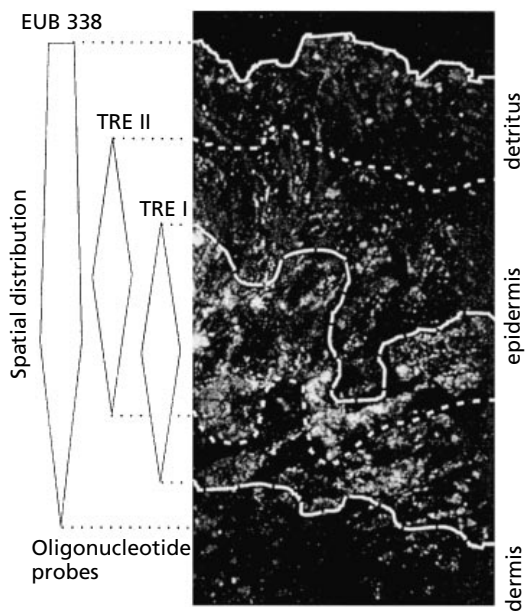
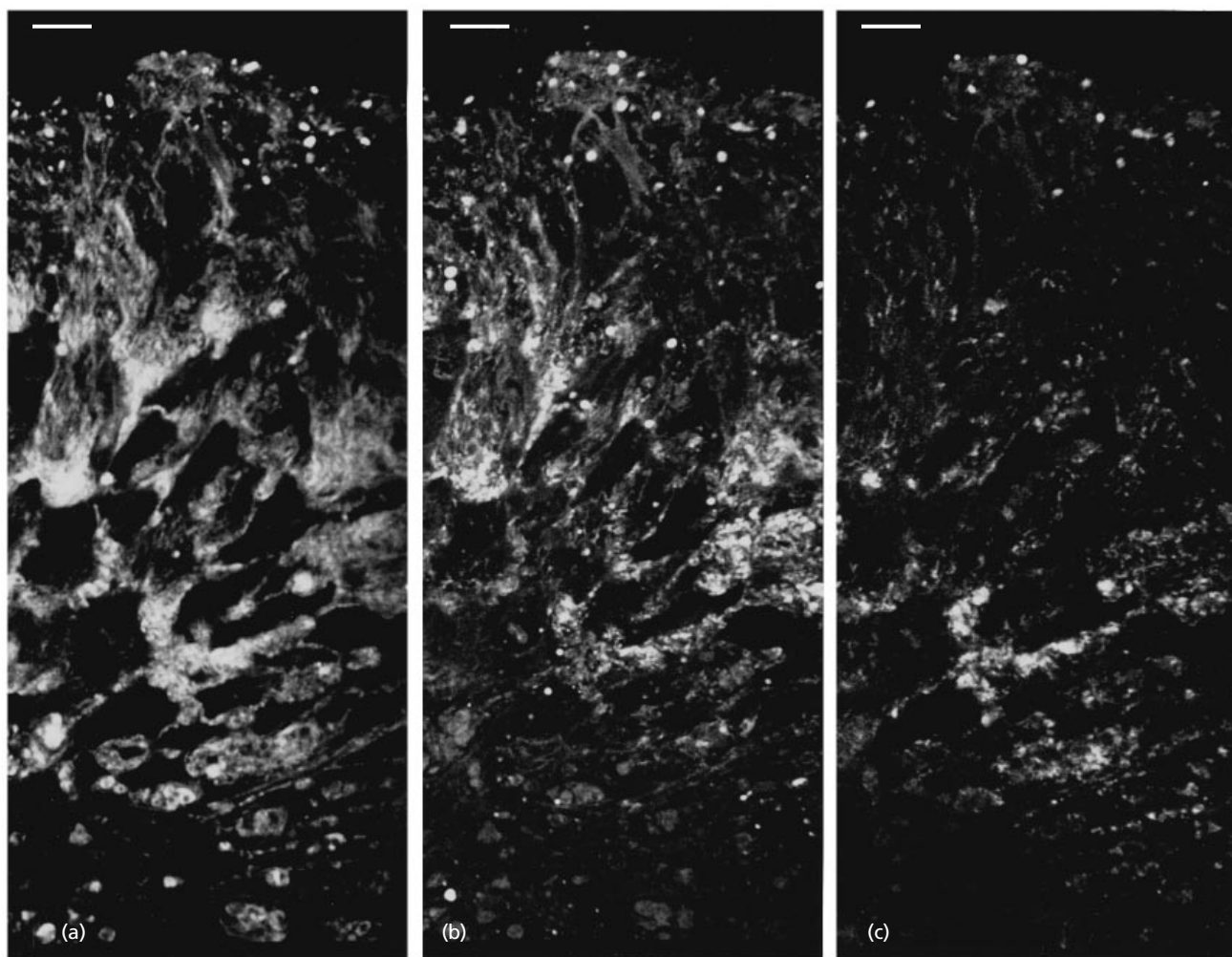


Fig. 2. Spatial distribution of treponemes within the epidermis as shown by CLSM. Identical microscopic fields after simultaneous hybridization with (a) EUB 338_{FITC}, (b) TRE II_{Cy3} and (c) TRE I_{Cy5} are shown. Note the stratification of the different phylotypes. Bars, 15 μ m. The diagram on the left highlights the features shown in (a)–(c).

DISCUSSION

FISH is a powerful technique for the investigation of mixed populations of micro-organisms in their natural environments. It has been used to visualize cultivable and as yet uncultured bacteria in activated sludge (Wagner *et al.*, 1994a, b, 1995) and in clinical and pathological samples (McNicol & Farquharson, 1997). It enables phylogenetic identification using 16S rRNA-directed oligonucleotide probes in addition to providing information on size, morphology and numbers of bacteria. The method has been further improved by CLSM, allowing optical sectioning, three-dimensional reconstruction and therefore exact localization and observation of the spatial distribution of micro-organisms (Amann *et al.*, 1996; MacNaughton *et al.*, 1996; Manz *et al.*, 1995; Surmann *et al.*, 1996; Wilson, 1989; Wright & Schatten, 1991).

In the past, visualization of bacteria by FISH within biopsy sections was hampered by high levels of non-specific background staining in paraffin-embedded tissue (Licht *et al.*, 1996; Poulsen *et al.*, 1994). Better results have been reported using cryostat sections; however, a low signal-to-noise ratio did not allow the exact histological localization and simultaneous detailed morphological description of the target organisms (Forsgren *et al.*, 1994, 1996). Bacteria have been successfully detected in tissue sections by using radioactively labelled (Ward *et al.*, 1996), digoxigenin-labelled or sulphonated probes with subsequent immunoenzymic detection, although all three methods require extensive prehybridization, blocking, washing and detection steps. Therefore, ISH has been considered a laborious, time-consuming method, unsuitable for diagnostic investigations (Theil *et al.*, 1996). Furthermore, additional pretreatment of the sections with Proteinase K is often necessary to allow binding of the oligonucleotide probes (Arnoldi *et al.*, 1992; Karttunen *et al.*, 1996; Yoshii *et al.*, 1995). In some specimens only weak signals have been obtained even after proteinase digestion (Yoshii *et al.*, 1995) and high concentrations of Proteinase K have resulted in tissue destruction (Karttunen *et al.*, 1996). Since we were interested in elucidating the aetiology of mixed infections, such as DD or human periodontitis, the use of oligonucleotide probes labelled with different fluorescent dyes would allow simultaneous visualization of more than one bacterial species within inflamed tissue. Recent comparative 16S rRNA analysis has allowed determination of the phylogeny of mainly uncultured spirochaetes in both DD and human periodontitis (Choi *et al.*, 1997, 1994; Rijpkema *et al.*, 1997). Light microscopy showed that spirochaetes were the predominant morphotype in both diseases. However, as these diseases are mixed bacterial infections, the mere presence of a given species or morphotype does not prove its aetiological relevance.

Among the cultivable oral species, *T. denticola*, a member of the group II treponemes, is thought to play a mayor role in initiating and maintaining periodontitis. Extensive *in vitro* studies have been performed to

analyse its virulence factors, suggesting the invasive potential of *T. denticola* (Arakawa & Kuramitsu, 1994; Baehni *et al.*, 1992; Ellen *et al.*, 1994; Grenier *et al.*, 1990; Rosen *et al.*, 1994, 1995; Syed *et al.*, 1993; Uitto *et al.*, 1995). Closely related bacteria were detected in smears of DD lesions using 16S rRNA analysis. In the study reported here, FISH gave positive signals with TRE II only in detritus and superficial layers of the stratum spinosum of DD ulcers, suggesting that *T. denticola*-related treponemes were not the key pathogens in the cases investigated. However, treponemes residing deep within the tissue stained positive with probes DDK 4, TRE I and IV, the latter two having been originally designed for detection of oral treponemes (Moter *et al.*, 1998). The morphotype that migrated deepest into the epidermis only stained positive with EUB 338, but failed to react with any of the spirochaete probes used here. This might be due to the fact that the available probes do not enable detection of all spirochaetes, underlining the considerable diversity of this group. In addition, at present it cannot be excluded that these organisms may be fusobacteria, known to co-aggregate with oral treponemes (Kolenbrander *et al.*, 1995) and further FISH studies are required to address this question.

In conclusion, fluorescence *in situ* hybridization on sections of plastic-embedded tissue appears to be of potential value in elucidating the aetiopathogenesis of mixed bacterial infections and in allowing rapid diagnosis in infections in animals and man. In particular, FISH on tissue sections of DD-infected cows showed a spatial distribution of as yet uncultured treponemes within the epidermis. Since tissue invasion is considered a major virulence trait, some treponemes appear to have a role in the pathogenesis of this disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been supported by a grant from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (01K19318) to U.B.G. The authors would like to thank K. Heuner and R. Schumann for carefully reading the manuscript.

REFERENCES

- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1919–1925.
- Amann, R., Springer, N., Ludwig, W., Görtz, H.-D. & Schleifer, K. H. (1991). Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* **351**, 161–164.
- Amann, R., Snaidr, J., Wagner, M., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1996). *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J Bacteriol* **178**, 3496–3500.
- Arakawa, S. & Kuramitsu, H. K. (1994). Cloning and sequence analysis of a chymotrypsin like protease from *Treponema denticola*. *Infect Immun* **62**, 3424–3433.
- Arnoldi, J., Schlüter, C., Duchrow, M., Hübner, L., Ernst, M., Teske, A., Flad, H.-D., Gerdes, J. & Böttger, E. C. (1992). Species-specific assessment of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies by

- in situ* hybridization and polymerase chain reaction. *Lab Invest* **66**, 618–623.
- Baehni, P. C., Song, M., McCulloch, A. G. & Ellen, R. P. (1992). *Treponema denticola* induces actin rearrangement and detachment of human gingival fibroblasts. *Infect Immun* **60**, 3360–3368.
- Blowey, R. W. & Sharp, M. W. (1988). Digital dermatitis in dairy cattle. *Vet Rec* **122**, 505–508.
- Blowey, R. W., Sharp, M. W. & Done, S. H. (1992). Digital dermatitis. *Vet Rec* **131**, 39.
- Blowey, R. W., Done, S. H. & Cooley, W. (1994). Observation on the pathogenesis of digital dermatitis in cattle. *Vet Rec* **135**, 115–117.
- Cheli, R. & Mortellaro, C. (1974). La dermatite digitale del bovino. In *Proceedings of the 8th International Conference on Diseases of Cattle*, pp. 208–213.
- Choi, B.-K., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Göbel, U. B. (1994). Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect Immun* **62**, 1889–1895.
- Choi, B.-K., Nattermann, H., Grund, S., Haider, W. & Göbel, U. B. (1997). Spirochetes from digital dermatitis lesions in cattle are closely related to treponemes associated with human periodontitis. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 175–181.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S. & Pace, N. R. (1989). Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* **243**, 1360–1363.
- Done, S. H., Blowey, R. W. & Cooley, W. (1993). The pathology of digital dermatitis in cattle in the UK. In *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Meeting, Las Vegas, Nevada*, p. 69.
- Elias, E. A. & Bosma, R. (1987). Silver staining for micro-organisms in tissue sections of paraffin and plastic-embedded material. *Cell Mol Biol* **33**, 711–732.
- Ellen, R. P., Dawson, J. R. & Yang, P. F. (1994). *Treponema denticola* as a model for polar adhesion and cytopathogenicity of spirochetes. *Trends Microbiol* **2**, 114–119.
- Forsgren, J., Samuelson, A., Ahlin, A., Jonasson, J., Rynnel-Dagöö, B. & Lindberg, A. (1994). *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by *in situ* hybridization and bacterial viability assay. *Infect Immun* **62**, 673–679.
- Forsgren, J., Samuelson, A., Borrelli, S., Christensson, B., Jonasson, J. & Lindberg, A. (1996). Persistence of nontypeable *Haemophilus influenzae* in adenoid macrophages: a putative colonization mechanism. *Acta Oto-laryngol* **116**, 766–773.
- Grenier, D., Uitto, V.-J. & McBride, B. C. (1990). Cellular location of a *Treponema denticola* chymotrypsin like protease and importance of the protease in migration through the basement membrane. *Infect Immun* **58**, 347–351.
- Karttunen, T. J., Genta, R. M., Yoffe, B., Hachem, C. Y., Graham, D. Y. & El-Zaatari, F. A. (1996). Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin embedded gastric biopsy specimens by *in situ* hybridization. *Anat Pathol* **106**, 305–311.
- Kolenbrander, P. E., Parrish, K. D., Andersen, R. N. & Greenberg, E. P. (1995). Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infect Immun* **63**, 4584–4588.
- Licht, T. R., Krogfelt, K. A., Cohen, P. S., Poulsen, L. K., Urbance, J. & Molin, S. (1996). Role of lipopolysaccharide in colonization of the mouse intestine by *Salmonella typhimurium* studied by *in situ* hybridization. *Infect Immun* **64**, 3811–3817.
- MacNaughton, S. J., Booth, T., Embley, T. M. & O'Donnell, A. G. (1996). Physical stabilization and confocal microscopy of bacteria on roots using 16S rRNA targeted, fluorescent-labeled oligonucleotide probes. *J Microbiol Methods* **26**, 279–285.
- McNicol, A. M. & Farquharson, M. A. (1997). *In situ* hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J Pathol* **182**, 250–261.
- Manz, W., Amann, R., Szewzyk, R., Szewzyk, U., Stenström, T.-A., Hutzler, P. & Schleifer, K.-H. (1995). *In situ* identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* **141**, 29–39.
- Moter, A., Hoenig, C., Choi, B.-K., Riep, B. & Göbel, U. B. (1998). Molecular epidemiology of oral treponemes in periodontal disease. *J Clin Microbiol* **36**, 1399–1403.
- Poulsen, L. K., Lan, F., Kristensen, C. S., Hobolth, P., Molin, S. & Krogfelt, K. A. (1994). Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA *in situ* hybridization. *Infect Immun* **62**, 5191–5194.
- Read, D. H., Walker, R. L., Castro, A. E., Sundber, J. P. & Thurmond, M. C. (1992). An invasive spirochaete associated with interdental papillomatosis of dairy cattle. *Vet Rec* **130**, 59–60.
- Rijkema, S. G. T., David, G. P., Hughes, S. L. & Woodward, M. J. (1997). Partial identification of spirochaetes from two dairy cows with digital dermatitis by polymerase chain reaction analysis of the 16S ribosomal RNA gene. *Vet Rec* **140**, 257–259.
- Rosen, G., Naor, R., Kutner, S. & Sela, M. N. (1994). Characterization of fibrinolytic activities of *Treponema denticola*. *Infect Immun* **62**, 1749–1754.
- Rosen, G., Naor, R., Rahamim, E., Yishai, R. & Sela, M. N. (1995). Proteases of *Treponema denticola* outer sheath and extracellular vesicles. *Infect Immun* **63**, 3973–3979.
- Surmann, S. B., Walker, J. T., Goddard, D. T., Morton, L. H. G., Keevil, C. W., Weaver, W., Skinner, A., Hanson, K., Caldwell, D. & Kurtz, J. (1996). Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *J Microbiol Methods* **25**, 57–70.
- Syed, S. A., Mäkinen, K. K., Mäkinen, P.-J., Chen, C.-Y. & Muhammad, Z. (1993). Proteolytic and oxidoreductase activity of *Treponema denticola* ATCC 35405 grown in an aerobic and anaerobic gaseous environment. *Res Microbiol* **144**, 317–326.
- Theil, D., Hoop, R., Herring, A. J. & Pospischil, A. (1996). Detection of chlamydia in formalin-fixed and paraffin-embedded avian tissue by *in situ* hybridization. A comparison between *in situ* hybridization and peroxidase–antiperoxidase labeling. *J Vet Med B* **43**, 356–370.
- Uitto, V.-J., Pan, Y.-M., Keung Leung, W., Larjava, H., Ellen, R. P., Finlay, B. B. & McBride, B. C. (1995). Cytopathic effects of *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase on migrating and stratified epithelial cells. *Infect Immun* **63**, 3401–3410.
- Wagner, M., Amann, R., Kämpfer, P., ABmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N. & Schleifer, K.-H. (1994a). Identification and *in situ* detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst Appl Microbiol* **17**, 405–417.
- Wagner, M., ABmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P. & Amann, R. (1994b). *In situ* analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *J Microsc (Oxf)* **176**, 181–187.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.-P. & Schleifer, K.-H. (1995). *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* **18**, 251–264.

Ward, J. M., Benveniste, R. E., Fox, C. H., Battles, J. K., Gonda, M. A. & Tully, J. G. (1996). Autoimmunity in chronic active *Helicobacter* hepatitis of mice. *Am J Pathol* **148**, 509–517.

Weaver, A. D. & Court, C. M. (1993). Current concepts of digital dermatitis and papillomatosis in cattle. In 2. *Internationaler Kongreß für Orthopädie bei Huf- und Klautentieren*, pp. 165–170.

Wilson, T. (1989). Confocal light microscopy. *Ann N Y Acad Sci* **438**, 416–426.

Wright, S. J. & Schatten, G. (1991). Confocal fluorescence microscopy and three dimensional reconstruction. *J Electron Microsc Tech* **18**, 2–10.

Wyss, C., Choi, B.-K., Schüpbach, P., Guggenheim, B. & Göbel, U. B. (1996). *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 745–752.

Yoshii, A., Koji, T., Ohsawa, N. & Nakane, P. K. (1995). *In situ* localization of ribosomal RNAs is a reliable reference for hybridizable RNA in tissue sections. *J Histochem Cytochem* **43**, 321–327.

.....
Received 21 January 1998; revised 7 May 1998; accepted 19 May 1998.

2.3.3.2. Zusammenfassung

Die Dermatitis digitalis des Rindes ist eine bakterielle Klauenseuche, deren Ätiologie noch weitestgehend ungeklärt ist. In den chronischen, epidermalen Ulzerationen findet sich regelmäßig eine aerob-anaerobe Mischflora, welche mikroskopisch einen großen Anteil von Spirochäten zeigt. Molekularbiologische Analysen belegten eine große Diversität an bisher nicht kultivierten Treponemen, welche nahe mit den Treponemen der humanen Parodontitis verwandt waren. Durch FISH von Gewebsschnitten von DD-Biopsien konnten diese Treponemen visualisiert und identifiziert werden. Er zeigte sich ein reicher mikrobieller Biofilm mit verschiedensten bakteriellen Morphotypen im Ulkusgrund der Läsionen, welcher insbesondere an der Grenzfläche zur Epidermis ein dichtes Geflecht von Treponemen aufwies. Einzelne Treponemen lösten sich aus dem Biofilmverband und waren in den Zwischenzellräumen in der Tiefe des Gewebes darstellbar. Insbesondere Treponemen der phylogenetischen Gruppe I waren tief in der Epidermis nachweisbar.

So konnte mit Hilfe der FISH exemplarisch für die Dermatitis digitalis die Grenzfläche zwischen Biofilmen und Gewebe untersucht werden. Es zeigte sich ein massiver bakterieller Befall der DD-Ulzerationen, unter denen die nicht kultivierten Treponemen an vorderster Invasionsfront mittels FISH zu identifizieren waren. Dies spricht für eine ätiologische Bedeutung dieser Spirochäten bei der Pathogenese der DD.

2.3.3.3. Ausblick

Es stellte sich die Frage, ob die Gewebe und Zellen, welche von Treponemen befallen werden, noch vital sind. Für eine orientierende Untersuchung wurde die Kombination von FISH mit der TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbung zum Nachweis apoptotischer/nekrotischer Zellen etabliert. Bei der TUNEL-Technik werden DNA-Enden mit Hilfe einer terminalen Transferase mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (z.B. FITC-dUTP) markiert (45). Durch Apoptose fragmentierte oder nekrotische Zellkerne lassen sich dadurch fluoreszenzmikroskopisch darstellen. Es zeigte sich, dass die Treponemen in bereits nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen bis in den Zellkern vordringen. Zellkerne, die erst einen beginnenden Zelltod zeigen (in der TUNEL Markierung schwach positiv), wurden noch nicht befallen, jedoch gezielt umlagert (Abb. 16). So scheinen die Treponemen das Nährstoffangebot abgestorbener Zellen zu nutzen. Ungeklärt bleibt, ob Treponemen in der Lage sind, Apoptose zu

induzieren, wie es für Fusobakterien bereits *in vitro* gezeigt wurde (53). Durch die Kombination von FISH mit anderen Färbemethoden lassen sich somit nicht nur Aussagen über Lokalisation und Identität von nicht kultivierbaren Mikroorganismen treffen, sondern auch die Interaktion mit dem Wirt untersuchen.



Abb. 16: FISH kombiniert mit TUNEL-Markierung an Hautbiopsien von DD Läsionen. Orange: DD Treponemen (DDK4_{CY3}-Sonde), Grün: TUNEL positive Zellkerne. (Balken 10 µm)

3. Synopsis

FISH ist ein viel versprechendes Verfahren, das sich zu einem wertvollen Instrument für die Analyse mikrobieller Biofilme sowie die mikrobiologische Routinediagnostik entwickelt hat. Sie schlägt eine Brücke zwischen Molekulargenetik und konventioneller Fluoreszenzmikroskopie und eignet sich damit auch für den Einsatz in den Laboratorien, die nicht die räumlichen, personellen und auch finanziellen Voraussetzungen für eine zuverlässige und kosteneffiziente molekulargenetische Diagnostik erfüllen.

Der Einsatz der FISH für diagnostische Fragestellungen wurde am Beispiel der Blutkulturdiagnostik, der Endokarditis und der Mykobakterien diskutiert. Dabei erwies sich die Technik insbesondere bei Infektionen durch schwer kultivierbare Erreger wie *Bartonella quintana*, *Tropheryma whipplei* oder *Mycobacterium leprae* sowie nach antibiotischer Vorbehandlung als hilfreich.

Durch die räumliche Auflösung kann die FISH Fragen beantworten, die derzeit mit keiner anderen Technik bearbeitet werden können.

So liefert sie wertvolle Informationen für die Infektionsbiologie, wie die Erforschung komplexer Biofilme, wie am Beispiel der Parodontitis gezeigt. Weiterhin kann sie für Untersuchungen zur Relevanz schwer kultivierbarer und nicht kultivierter Mikroorganismen, aber auch für funktionelle Analysen, wie Bakterium-Wirt Interaktionen eingesetzt werden. Diese Eigenschaft wurde bei den Untersuchungen zur Dermatitis digitalis genutzt. Darüber hinaus gibt die FISH Auskunft zum rRNA Gehalt einer einzelnen bakteriellen Zelle und somit ihrer Aktivität *in situ*, wie bei den Biofilmen der infektiösen Endokarditis demonstriert. Es ist daher denkbar, dass sogar Vitalitätsmessungen von Bakterien in Biofilmen möglich sind, was neue Perspektiven der *in situ* Analyse der Biofilm Regulation und Suszeptibilität gegenüber Antibiotika eröffnet.

4. Literatur

1. Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I. and Dewhirst, F.E. (2005). "Defining the normal bacterial flora of the oral cavity." *J Clin Microbiol* **43**(11): 5721-5732.
2. Alexander, B.D., Ashley, E.D., Reller, L.B. and Reed, S.D. (2006). "Cost savings with implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures." *Diagn Microbiol Infect Dis* **54**(4): 277-282.
3. Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A. (1990). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations." *Appl Environ Microbiol* **56**(6): 1919-1925.
4. Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." *Microbiol Rev* **59**(1): 143-169.
5. Beighton, D., Homer, K.A., Bouvet, A. and Storey, A.R. (1995). "Analysis of enzymatic activities for differentiation of two species of nutritionally variant streptococci, *Streptococcus defectivus* and *Streptococcus adjacens*." *J Clin Microbiol* **33**(6): 1584-1587.
6. Biedenbach, D.J., Moet, G.J. and Jones, R.N. (2004). "Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002)." *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**(1): 59-69.
7. Blowey, R.W., Sharp, M.W. and Done, S.H. (1992). "Digital dermatitis." *Vet Rec* **131**(2): 39.
8. Bosshard, P.P., Kronenberg, A., Zbinden, R., Ruef, C., Bottger, E.C. and Altwegg, M. (2003). "Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience." *Clin Infect Dis* **37**(2): 167-172.
9. Bouvet, A. (1995). "Human endocarditis due to nutritionally variant streptococci: *Streptococcus adjacens* and *Streptococcus defectivus*." *Eur Heart J* **16 Suppl B**: 24-27.
10. Bradshaw, D.J. and Marsh, P.D. (1999). "Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms." *Methods Enzymol* **310**: 279-296.
11. Breitkopf, C., Hammel, D., Scheld, H.H., Peters, G. and Becker, K. (2005). "Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis." *Circulation* **111**(11): 1415-1421.
12. Brouqui, P. and Raoult, D. (2001). "Endocarditis due to rare and fastidious bacteria." *Clin Microbiol Rev* **14**(1): 177-207.
13. Brouqui, P. and Raoult, D. (2006). "New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis." *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**(1): 1-13.
14. Brown, T., Nikolayevskyy, V., Velji, P. and Drobniowski, F. (2010). "Associations between *Mycobacterium tuberculosis* strains and phenotypes." *Emerg Infect Dis* **16**(2): 272-280.
15. Bruijnis, M.R., Hogeveen, H. and Stassen, E.N. (2010). "Assessing economic consequences of foot disorders in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model." *J Dairy Sci* **93**(6): 2419-2432.

16. Casalta, J.P., Gouriet, F., Roux, V., Thuny, F., Habib, G. and Raoult, D. (2009). "Evaluation of the LightCycler SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**(6): 569-573.
17. Cheli, R.M., C. (1974). "La dermatite digitale del bovino." *Proceedings of the 8th International Conference on Diseases of Cattle*: 208-213.
18. Choi, B.K., Nattermann, H., Grund, S., Haider, W. and Göbel, U.B. (1997). "Spirochetes from digital dermatitis lesions in cattle are closely related to treponemes associated with human periodontitis." *Int J Syst Bacteriol* **47**(1): 175-181.
19. Choi, B.K., Paster, B.J., Dewhirst, F.E. and Göbel, U.B. (1994). "Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis." *Infect Immun* **62**(5): 1889-1895.
20. Collins, M.D. and Lawson, P.A. (2000). "The genus *Abiotrophia* (Kawamura et al.) is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov. and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 1**: 365-369.
21. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. and James, G. (1994). "Biofilms, the customized microniche." *J Bacteriol* **176**(8): 2137-2142.
22. Daims, H., Lucker, S. and Wagner, M. (2006). "daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research." *Environ Microbiol* **8**(2): 200-213.
23. Daims, H. and Wagner, M. (2007). "Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis." *Appl Microbiol Biotechnol* **75**(2): 237-248.
24. Davis, T.E. and Fuller, D.D. (1991). "Direct identification of bacterial isolates in blood cultures by using a DNA probe." *J Clin Microbiol* **29**(10): 2193-2196.
25. de Sa, D.D., Tleyjeh, I.M., Anavekar, N.S., Schultz, J.C., Thomas, J.M., Lahr, B.D., Bachuwar, A., Pazdernik, M., Steckelberg, J.M., Wilson, W.R. and Baddour, L.M. (2010). "Epidemiological trends of infective endocarditis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota." *Mayo Clin Proc* **85**(5): 422-426.
26. Dewhirst, F.E., Tamer, M.A., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Boches, S.K., Galvin, J.L. and Paster, B.J. (2000). "The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis." *Oral Microbiol Immunol* **15**(3): 196-202.
27. Donlan, R.M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." *Emerg Infect Dis* **8**(9): 881-890.
28. Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clin Microbiol Rev* **15**(2): 167-193.
29. Flemming, H.-C., Neu, T.R. and Wozniak, D.J. (2007). "The EPS matrix: the "house of biofilm cells"." *Journal of Bacteriology* **189**(22): 7945-7947.
30. Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2001). "Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien." *Biologie in unserer Zeit* **31**(3): 169-180.
31. Flemming, H.C. and Wingender, J. (2001). "Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects." *Water Sci Technol* **43**(6): 1-8.
32. Flemming, H.C. and Wingender, J. (2001). "Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects." *Water Sci Technol* **43**(6): 9-16.

33. Fournier, P.E., Casalta, J.P., Habib, G., Messana, T. and Raoult, D. (1996). "Modification of the diagnostic criteria proposed by the Duke Endocarditis Service to permit improved diagnosis of Q fever endocarditis." *Am J Med* **100**(6): 629-633.
34. Fuqua, C. and Greenberg, E.P. (2002). "Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 685-695.
35. Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. (1994). "Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators." *J Bacteriol* **176**(2): 269-275.
36. Gauduchon, V., Chalabreysse, L., Etienne, J., Celard, M., Benito, Y., Lepidi, H., Thivolet-Bejui, F. and Vandenesch, F. (2003). "Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue." *J Clin Microbiol* **41**(2): 763-766.
37. Gescher, D.M., Kovacevic, D., Schmiedel, D., Siemoneit, S., Mallmann, C., Halle, E., Göbel, U.B. and Moter, A. (2008). "Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures." *Int J Antimicrob Agents* **32 Suppl 1**: S51-59.
38. Gescher, D.M., Mallmann, C., Kovacevic, D., Schmiedel, D., Borges, A.C., Schweickert, B., Göbel, U.B. and Moter, A. (2008). "A view on Bartonella quintana endocarditis--confirming the molecular diagnosis by specific fluorescence in situ hybridization." *Diagn Microbiol Infect Dis* **60**(1): 99-103.
39. Göbel, U.B. (1991). Targeting ribosomal RNA sequences: a universal approach to the detection and identification of microorganisms. *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*. Vaheri, A., Tilton, R.C., Balows, A., . Heidelberg, Springer: 27-36.
40. Goldenberger, D., Kunzli, A., Vogt, P., Zbinden, R. and Altwegg, M. (1997). "Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing." *J Clin Microbiol* **35**(11): 2733-2739.
41. Greub, G., Lepidi, H., Rovey, C., Casalta, J.P., Habib, G., Collard, F., Fournier, P.E. and Raoult, D. (2005). "Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery." *Am J Med* **118**(3): 230-238.
42. Grund, S., Nattermann, H. and Horsch, F. (1995). "[Electron microscopic detection of spirochetes in dermatitis digitalis of cattle]." *Zentralbl Veterinarmed B* **42**(9): 533-542.
43. Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. (2009). "Evolving concepts in biofilm infections." *Cell Microbiol* **11**(7): 1034-1043.
44. Haussler, S. and Parsek, M.R. (2010). "Biofilms 2009: New perspectives at the heart of surface-associated microbial communities." *J Bacteriol*.
45. Hewitson, T.D., Bisucci, T. and Darby, I.A. (2000). "In situ end-labeling of fragmented DNA and the localization of apoptosis." *Methods Mol Biol* **123**: 157-164.
46. Hill, E.E., Herijgers, P., Claus, P., Vanderschueren, S., Herregods, M.C. and Peetermans, W.E. (2007). "Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study." *Eur Heart J* **28**(2): 196-203.
47. Hill, E.E., Herijgers, P., Herregods, M.C. and Peetermans, W.E. (2006). "Evolving trends in infective endocarditis." *Clin Microbiol Infect* **12**(1): 5-12.
48. Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O. (2010). "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." *Int J Antimicrob Agents* **35**(4): 322-332.

49. Hongmanee, P., Stender, H. and Rasmussen, O.F. (2001). "Evaluation of a fluorescence in situ hybridization assay for differentiation between tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species in smears of Lowenstein-Jensen and *Mycobacteria* Growth Indicator Tube cultures using peptide nucleic acid probes." *J Clin Microbiol* **39**(3): 1032-1035.
50. Honisch, C., Mosko, M., Arnold, C., Gharbia, S.E., Diel, R. and Niemann, S. (2010). "Replacing reverse line blot hybridization spoligotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex." *J Clin Microbiol* **48**(5): 1520-1526.
51. Jansen, G.J., Mooibroek, M., Idema, J., Harmsen, H.J., Welling, G.W. and Degener, J.E. (2000). "Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes." *J Clin Microbiol* **38**(2): 814-817.
52. Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. and van Embden, J. (1997). "Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology." *J Clin Microbiol* **35**(4): 907-914.
53. Kaplan, C.W., Lux, R., Huynh, T., Jewett, A., Shi, W. and Haake, S.K. (2005). "*Fusobacterium nucleatum* apoptosis-inducing outer membrane protein." *J Dent Res* **84**(8): 700-704.
54. Kempf, V.A., Mandle, T., Schumacher, U., Schafer, A. and Autenrieth, I.B. (2005). "Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry." *Int J Med Microbiol* **295**(1): 47-55.
55. Kempf, V.A., Trebesius, K. and Autenrieth, I.B. (2000). "Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures." *J Clin Microbiol* **38**(2): 830-838.
56. Koegelenberg, C.F., Doubell, A.F., Orth, H. and Reuter, H. (2004). "Infective endocarditis: improving the diagnostic yield." *Cardiovasc J S Afr* **15**(1): 14-20.
57. Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Kazmerzak, K., Wu, R. and Palmer, R.J., Jr. (1999). "Spatial organization of oral bacteria in biofilms." *Methods Enzymol* **310**: 322-332.
58. Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Jr., Rickard, A.H., Jakubovics, N.S., Chalmers, N.I. and Diaz, P.I. (2006). "Bacterial interactions and successions during plaque development." *Periodontol 2000* **42**: 47-79.
59. Konig, J., Holtfreter, B. and Kocher, T. (2010). "Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services--position paper 1." *Eur J Dent Educ* **14 Suppl 1**: 4-24.
60. Kotilainen, P., Heiro, M., Jalava, J., Rantakokko, V., Nikoskelainen, J., Nikkari, S. and Rantakokko-Jalava, K. (2006). "Aetiological diagnosis of infective endocarditis by direct amplification of rRNA genes from surgically removed valve tissue. An 11-year experience in a Finnish teaching hospital." *Ann Med* **38**(4): 263-273.
61. La Scola, B. and Raoult, D. (1996). "Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*." *J Clin Microbiol* **34**(9): 2270-2274.
62. La Scola, B. and Raoult, D. (2009). "Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry." *PLoS One* **4**(11): e8041.
63. Lang, S., Watkin, R.W., Lambert, P.A., Bonser, R.S., Littler, W.A. and Elliott, T.S. (2004). "Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis." *J Infect* **48**(3): 269-275.

64. Lang, S., Watkin, R.W., Lambert, P.A., Littler, W.A. and Elliott, T.S. (2004). "Detection of bacterial DNA in cardiac vegetations by PCR after the completion of antimicrobial treatment for endocarditis." *Clin Microbiol Infect* **10**(6): 579-581.
65. Lee, A., Mirrett, S., Reller, L.B. and Weinstein, M.P. (2007). "Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed?" *J Clin Microbiol* **45**(11): 3546-3548.
66. Lefmann, M., Honisch, C., Bocker, S., Storm, N., von Wintzingerode, F., Schlotelburg, C., Moter, A., van den Boom, D. and Göbel, U.B. (2004). "Novel mass spectrometry-based tool for genotypic identification of mycobacteria." *J Clin Microbiol* **42**(1): 339-346.
67. Lefmann, M., Schweickert, B., Buchholz, P., Göbel, U.B., Ulrichs, T., Seiler, P., Theegarten, D. and Moter, A. (2006). "Evaluation of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections." *J Clin Microbiol* **44**(10): 3760-3767.
68. Lepidi, H., Casalta, J.P., Fournier, P.E., Habib, G., Collart, F. and Raoult, D. (2005). "Quantitative histological examination of mechanical heart valves." *Clin Infect Dis* **40**(5): 655-661.
69. Lewis, K. (2007). "Persister cells, dormancy and infectious disease." *Nat Rev Microbiol* **5**(1): 48-56.
70. Li, J.S., Sexton, D.J., Mick, N., Nettles, R., Fowler, V.G., Jr., Ryan, T., Bashore, T. and Corey, G.R. (2000). "Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis." *Clin Infect Dis* **30**(4): 633-638.
71. Ly, T., Gulia, J., Pyrgos, V., Waga, M. and Shoham, S. (2008). "Impact upon clinical outcomes of translation of PNA FISH-generated laboratory data from the clinical microbiology bench to bedside in real time." *Ther Clin Risk Manag* **4**(3): 637-640.
72. Madico, G.E. and Rice, P.A. (2008). "16S-Ribosomal DNA to diagnose culture-negative endocarditis." *Curr Infect Dis Rep* **10**(4): 280-286.
73. Mallmann, C., Siemoneit, S., Schmiedel, D., Petrich, A., Gescher, D.M., Halle, E., Musci, M., Hetzer, R., Göbel, U.B. and Moter, A. (2009). "Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study." *Clin Microbiol Infect*.
74. Manero, A. and Blanch, A.R. (2002). "Identification of *Enterococcus* spp. based on specific hybridisation with 16S rDNA probes." *J Microbiol Methods* **50**(2): 115-121.
75. Marin, M., Munoz, P., Sanchez, M., del Rosal, M., Alcalá, L., Rodríguez-Creixems, M. and Bouza, E. (2007). "Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue." *Medicine (Baltimore)* **86**(4): 195-202.
76. Maurin, M., Eb, F., Etienne, J. and Raoult, D. (1997). "Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis." *J Clin Microbiol* **35**(9): 2283-2287.
77. Moreillon, P. and Que, Y.A. (2004). "Infective endocarditis." *Lancet* **363**(9403): 139-149.
78. Moter, A. and Göbel, U.B. (2000). "Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms." *J Microbiol Methods* **41**(2): 85-112.
79. Moter, A., Hoenig, C., Choi, B.K., Riep, B. and Göbel, U.B. (1998). "Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease." *J Clin Microbiol* **36**(5): 1399-1403.

80. Moter, A., Leist, G., Rudolph, R., Schrank, K., Choi, B.K., Wagner, M. and Göbel, U.B. (1998). "Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions." *Microbiology* **144 (Pt 9)**: 2459-2467.
81. Moter, A., Riep, B., Haban, V., Heuner, K., Siebert, G., Berning, M., Wyss, C., Ehmke, B., Flemmig, T.F. and Göbel, U.B. (2006). "Molecular epidemiology of oral treponemes in patients with periodontitis and in periodontitis-resistant subjects." *J Clin Microbiol* **44(9)**: 3078-3085.
82. Munson, E.L., Diekema, D.J., Beekmann, S.E., Chapin, K.C. and Doern, G.V. (2003). "Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management." *J Clin Microbiol* **41(1)**: 495-497.
83. Mylonakis, E. and Calderwood, S.B. (2001). "Infective endocarditis in adults." *N Engl J Med* **345(18)**: 1318-1330.
84. Naber, C.K. and Erbel, R. (2007). "Infective endocarditis with negative blood cultures." *Int J Antimicrob Agents* **30 Suppl 1**: S32-36.
85. Oliveira, K., Brecher, S.M., Durbin, A., Shapiro, D.S., Schwartz, D.R., De Girolami, P.C., Dakos, J., Procop, G.W., Wilson, D., Hanna, C.S., Haase, G., Peltroche-Llacsahuanga, H., Chapin, K.C., Musgnug, M.C., Levi, M.H., Shoemaker, C. and Stender, H. (2003). "Direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles." *J Clin Microbiol* **41(2)**: 889-891.
86. Oliveira, K., Procop, G.W., Wilson, D., Coull, J. and Stender, H. (2002). "Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes." *J Clin Microbiol* **40(1)**: 247-251.
87. Parsek, M.R. and Singh, P.K. (2003). "Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis." *Annu Rev Microbiol* **57**: 677-701.
88. Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A. and Dewhirst, F.E. (2001). "Bacterial diversity in human subgingival plaque." *J Bacteriol* **183(12)**: 3770-3783.
89. Paster, B.J. and Dewhirst, F.E. (2000). "Phylogenetic foundation of spirochetes." *J Mol Microbiol Biotechnol* **2(4)**: 341-344.
90. Paster, B.J., Olsen, I., Aas, J.A. and Dewhirst, F.E. (2006). "The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites." *Periodontol 2000* **42**: 80-87.
91. Pignone, M., Greth, K.M., Cooper, J., Emerson, D. and Tang, J. (2006). "Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry." *J Clin Microbiol* **44(6)**: 1963-1970.
92. Podglajen, I., Bellery, F., Poyart, C., Coudol, P., Buu-Hoi, A., Bruneval, P. and Mainardi, J.L. (2003). "Comparative molecular and microbiologic diagnosis of bacterial endocarditis." *Emerg Infect Dis* **9(12)**: 1543-1547.
93. Pratten, J. and Ready, D. (2010). "Use of biofilm model systems to study antimicrobial susceptibility." *Methods Mol Biol* **642**: 203-215.
94. Rice, P.A. and Madico, G.E. (2005). "Polymerase chain reaction to diagnose infective endocarditis: will it replace blood cultures?" *Circulation* **111(11)**: 1352-1354.
95. RKI (2010). Zur Tuberkulose in Deutschland im Jahr 2008. *Epidemiologisches Bulletin*, Robert Koch Institute. **No. 11**.

96. Roberts, R.B., Krieger, A.G., Schiller, N.L. and Gross, K.C. (1979). "Viridans streptococcal endocarditis: the role of various species, including pyridoxal-dependent streptococci." *Rev Infect Dis* **1**(6): 955-966.
97. Rovey, C., Greub, G., Lepidi, H., Casalta, J.P., Habib, G., Collart, F. and Raoult, D. (2005). "PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis." *J Clin Microbiol* **43**(1): 163-167.
98. Schweickert, B., Moter, A., Lefmann, M. and Göbel, U.B. (2004). "Let them fly or light them up: matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and fluorescence in situ hybridization (FISH)." *APMIS* **112**(11-12): 856-885.
99. Senn, L., Entenza, J.M., Greub, G., Jaton, K., Wenger, A., Bille, J., Calandra, T. and Prod'homme, G. (2006). "Bloodstream and endovascular infections due to *Abiotrophia defectiva* and *Granulicatella* species." *BMC Infect Dis* **6**: 9.
100. Sogaard, M., Hansen, D.S., Fiandaca, M.J., Stender, H. and Schonheyder, H.C. (2007). "Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* from positive blood cultures." *J Med Microbiol* **56**(Pt 7): 914-917.
101. Stender, H., Lund, K., Petersen, K.H., Rasmussen, O.F., Hongmanee, P., Miorner, H. and Godtfredsen, S.E. (1999). "Fluorescence In situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures." *J Clin Microbiol* **37**(9): 2760-2765.
102. Stender, H., Mollerup, T.A., Lund, K., Petersen, K.H., Hongmanee, P. and Godtfredsen, S.E. (1999). "Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-positive sputum samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes." *Int J Tuberc Lung Dis* **3**(9): 830-837.
103. Sternberg, C., Christensen, B.B., Johansen, T., Toftgaard Nielsen, A., Andersen, J.B., Givskov, M. and Molin, S. (1999). "Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms." *Appl Environ Microbiol* **65**(9): 4108-4117.
104. Stevenson, L.G., Drake, S.K. and Murray, P.R. (2010). "Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry." *J Clin Microbiol* **48**(2): 444-447.
105. Stewart, P.S. and Franklin, M.J. (2008). "Physiological heterogeneity in biofilms." *Nat Rev Microbiol* **6**(3): 199-210.
106. Stewart, P.S., Grab, L. and Diemer, J.A. (1998). "Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system." *J Appl Microbiol* **85**(3): 495-500.
107. Stewart, P.S., Rayner, J., Roe, F. and Rees, W.M. (2001). "Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates." *J Appl Microbiol* **91**(3): 525-532.
108. Tak, T. and Shukla, S.K. (2004). "Molecular diagnosis of infective endocarditis: a helpful addition to the Duke criteria." *Clin Med Res* **2**(4): 206-208.
109. Tanner, A., Maiden, M.F., Paster, B.J. and Dewhirst, F.E. (1994). "The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria." *Periodontol 2000* **5**: 26-51.
110. Thormann, K.M., Duttler, S., Saville, R.M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y. and Spormann, A.M. (2006). "Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP." *J Bacteriol* **188**(7): 2681-2691.

111. Tleyjeh, I.M., Abdel-Latif, A., Rahbi, H., Scott, C.G., Bailey, K.R., Steckelberg, J.M., Wilson, W.R. and Baddour, L.M. (2007). "A systematic review of population-based studies of infective endocarditis." *Chest* **132**(3): 1025-1035.
112. Trebesius, K., Leitritz, L., Adler, K., Schubert, S., Autenrieth, I.B. and Heesemann, J. (2000). "Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation." *Med Microbiol Immunol* **188**(4): 169-175.
113. Tuohy, M.J., Procop, G.W. and Washington, J.A. (2000). "Antimicrobial susceptibility of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva*." *Diagn Microbiol Infect Dis* **38**(3): 189-191.
114. Voldstedlund, M., Pedersen, L.N., Fursted, K. and Nielsen, L.P. (2003). "Different polymerase chain reaction-based analyses for culture-negative endocarditis caused by *Streptococcus pneumoniae*." *Scand J Infect Dis* **35**(10): 757-759.
115. Wagner, M., Horn, M. and Daims, H. (2003). "Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes." *Curr Opin Microbiol* **6**(3): 302-309.
116. Wallet, F., Nseir, S., Baumann, L., Herwegh, S., Sendid, B., Boulo, M., Rousset-Delvallez, M., Durocher, A.V. and Courcol, R.J. (2009). "Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood." *Clin Microbiol Infect*.
117. Wallner, G., Amann, R. and Beisker, W. (1993). "Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms." *Cytometry* **14**(2): 136-143.
118. Wecke, J., Kersten, T., Madela, K., Moter, A., Göbel, U.B., Friedmann, A. and Bernimoulin, J. (2000). "A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets." *FEMS Microbiol Lett* **191**(1): 95-101.
119. Weinstein, M.P., Mirrett, S., Reimer, L.G., Wilson, M.L., Smith-Elekes, S., Chuard, C.R., Joho, K.L. and Reller, L.B. (1995). "Controlled evaluation of BacT/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture bottles for detection of bacteremia and fungemia." *J Clin Microbiol* **33**(4): 978-981.
120. Westh, H., Lisby, G., Breysse, F., Boddingtonhaus, B., Chomarat, M., Gant, V., Goglio, A., Raglio, A., Schuster, H., Stuber, F., Wissing, H. and Hoeft, A. (2009). "Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis." *Clin Microbiol Infect* **15**(6): 544-551.
121. Woese, C.R. (1987). "Bacterial evolution." *Microbiol Rev* **51**(2): 221-271.
122. Znazen, A., Rolain, J.M., Hammami, N., Kammoun, S., Hammami, A. and Raoult, D. (2005). "High prevalence of *Bartonella quintana* endocarditis in Sfax, Tunisia." *Am J Trop Med Hyg* **72**(5): 503-507.

5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Ulf Göbel, der mir in den langen Jahren in seinem Institut die Freiheit gegeben hat, Projekte zu entwickeln und zu verfolgen und neue Schwerpunkte zu setzen. Er hat mir früh die Verantwortung für den Aufbau des molekulardiagnostischen Labors übertragen und dessen Entstehung sowie den Aufbau der Arbeitsgruppe stets konstruktiv begleitet. Dabei schätze ich insbesondere den offenen Diskussionsstil, die Bereitschaft immer neue wissenschaftliche Kontakte zu knüpfen, und die Ermutigung zu interdisziplinärem Arbeiten, die das Profil der Arbeitsgruppe prägt.

Ich möchte mich bei den Herren Professor Dr. Hervé Bercovier, Dr. Holger Daims, P.D. Dr. Klaus Heuner, Dr. Ulrich Kertzsch, Dr. Michael Lefmann, Dr. Robert Palmer und Professor Dr. Alfred Spormann, bedanken. Diese Kollegen und Mentoren haben mich durch lebhafte Diskussionen, hilfreichen Rat und freundschaftliche Hilfe in meiner wissenschaftlichen Arbeit ganz wesentlich unterstützt.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die unermüdliche, engagierte und gut gelaunte Mitarbeit der Arbeitsgruppe bestehend aus technischen Assistentinnen, Doktoranden, Diplomanden, Bachelor-Studenten, Master-Studenten, Praktikanten aus Humanmedizin, Zahnmedizin, Veterinärmedizin, Biologie und Biotechnologie, die ich nicht alle namentlich nennen kann. Es ist eine große Freude mit diesem hoch motivierten und aktiven Team zu arbeiten. Insbesondere Frau Gitina Fiedler, Cindy Hefenbrock und Angela Pohlisch verdanke ich engagierte Hilfe, ohne die die Vereinbarkeit von Wissenschaft, Diagnostik, Lehre und Familie nicht möglich gewesen wäre. Frau Antje Grosse, Kathrin Rugor und Julia Schulze haben mich in jüngster Zeit bei vielen Laborprojekten hervorragend unterstützt. Frau Dr. Dorothee-Maria Gescher, Annett Petrich und Dinah Schmiedel, haben in besonderer Weise durch Mitarbeit, Ideen und Projekte den Charakter der Gruppe beeinflusst und mit gestaltet. Frau Dr. Judith Schmiedel danke ich für wertvolle Diskussionen und tatkräftige Umsetzung vieler Ideen. Sie bringt die Gruppe aktuell durch ihr beschwingtes Wesen und großes Engagement weiter voran.

Für die Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeiten und insbesondere für das Rahel Hirsch Stipendium danke ich der Nachwuchskommission und der Forschungskommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Auch bei den privaten Helfern Frau Monika Vogt, Marie Fiedler und Klara Stechel bedanke ich mich herzlich für die liebevolle Betreuung meiner Kinder.

Widmen möchte ich diese Arbeit meiner Familie.

Meine Eltern Frau Gertrud Moter und Herr Dr. Georg Moter haben meine Neugier geweckt, mich in das naturwissenschaftliche Denken eingeführt, und meine Ausbildung immer positiv und unterstützend begleitet. Hierfür gilt Ihnen mein besonderer Dank und Liebe. Einschließen möchte ich hier auch die Damen Hildegard und Margarete Grobbel und Frau Anna Hrankovicova, die mir jederzeit mit wertvollem Rat bei wichtigen Lebensentscheidungen und Hilfe in unruhigen Zeiten zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem Mann Dr. Ralf Kurth, und meinen Kindern Isabell und Emanuel, die mit sehr viel Geduld, Durchhaltevermögen, liebevoller Kritik und einem unkonventionellen Lebensstil ermöglicht haben, dass ich meine Forschungsaktivitäten und Kooperationen weltweit aufbauen, und diese Arbeit fertig stellen konnte. Dazu haben sie mir stets Mut gemacht und mich inspiriert, diesen Weg zu gehen und auch weiterhin fortzusetzen.

6. Erklärung

§4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

Datum

Unterschrift