

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

# **Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden zur direkten Identifizierung und Visualisierung von Mikroorganismen in der klinisch-mikrobiologischen Diagnostik**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Dinah Schmiedel  
aus Berlin

Gutachter:           1. Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel  
                          2. Priv.-Doz. Dr. U. Reischl  
                          3. Priv.-Doz. Dr. med. D. Theegarten

Datum der Promotion: 09.09.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1.	Kurzbeschreibung	1
1.2.	Einleitung	3
1.3.	Evaluation der FISH zur Diagnostik bei septischen Krankheitsbildern	4
1.3.1.	Identifizierung von Gram-positiven Kokken aus positiven Blutkulturen durch FISH	4
1.3.2.	FISH zur mikrobiologischen Diagnostik der infektiösen Endokarditis	6
1.4.	FISH zur Visualisierung von Mikroorganismen <i>in situ</i>	9
1.4.1.	Darstellung von Erregern der infektiösen Endokarditis <i>in situ</i> durch FISH	9
1.4.2.	Mikrobiologische Diagnose der humanen intestinalen Spirochätose durch FISH	10
1.5.	Ausblick	12
1.6.	Literaturverzeichnis	13
<b>2</b>	<b>Erklärung über den Anteil an den Publikationen</b>	<b>A1</b>
<b>3</b>	<b>Publikationen</b>	<b>A3</b>
3.1.	Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures	
3.2.	Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study	
3.3.	A view on <i>Bartonella quintana</i> endocarditis – confirming the molecular diagnosis by fluorescence in situ hybridization	
3.4.	Rapid and accurate Diagnosis of Human Intestinal Spirochetosis by Fluorescence In Situ Hybridization	
<b>4</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>A37</b>
<b>5</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>A38</b>
<b>6</b>	<b>Erklärung über die Eigenständigkeit</b>	<b>A39</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>A40</b>

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Kurzbeschreibung

In verschiedenen Bereichen der medizinischen Mikrobiologie erweisen sich die konventionellen, kulturbasierten Verfahren zur Diagnostik von Mikroorganismen insbesondere bei schwer anzüchtbaren Erregern oder antimikrobieller Vorbehandlung des Patienten als zeitaufwändig und oft erfolglos. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist eine molekularbiologische, kulturunabhängige Methode, die die direkte Visualisierung und Identifizierung von Mikroorganismen im Gewebe ermöglicht. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Evaluation der FISH für die mikrobiologische Diagnostik bei septischen Krankheitsbildern (Kapitel 1.3) sowie die Visualisierung von Mikroorganismen in Geweben *in situ* (Kapitel 1.4).

1.) Septische Krankheitsbilder: In dieser Arbeit wurde die FISH zur mikrobiologischen Diagnostik der Sepsis und infektiösen Endokarditis (IE) entwickelt und angewendet.

Im Bereich der Sepsisdiagnostik wurde eine FISH-Sondenkombination zur Identifizierung Gram-positiver Kokken entwickelt und auf 428 Blutkulturproben angewendet. Mit hoher Sensitivität und Spezifität gelang innerhalb von 3 Stunden die Erregeridentifizierung.

Bei IE ist die mikrobiologische Diagnose und Therapie durch den hohen Anteil Blutkultur-negativer Fälle problematisch. In dieser Arbeit wurden in 26 von 54 Herzklappenproben durch FISH Mikroorganismen nachgewiesen. Darunter waren 5 kulturnegative Fälle mit teilweise schwer anzüchtbaren Erregern wie *T. whipplei* oder *B. quintana*.

2.) Visualisierung von Mikroorganismen *in situ*: Die direkte Visualisierung von Mikroorganismen *in situ* in Gewebsschnitten erfolgte in resezierten Herzklappen sowie in Darmbiopsien bei humaner intestinaler Spirochätose (HIS).

In Herzklappen von Patienten mit IE gelang durch FISH die Differenzierung zwischen Kontamination und pathogenen Mikroorganismen sowie die Visualisierung komplexer bakterieller Biofilmstrukturen im Gewebe.

HIS wird durch Spirochäten des Genus *Brachyspira* hervorgerufen und kann zu chronischen gastrointestinalen Beschwerden führen. Da die Kultivierung von *Brachyspira* spezielle Nährböden und Inkubationszeiten von 2-6 Wochen erfordert, wird die Diagnose häufig nicht gestellt. In dieser Arbeit wurde eine *Brachyspira*-genusspezifische FISH-Sonde entwickelt, und es gelang eine detaillierte Darstellung und Identifizierung der *Brachyspira* spp. in Darmbiopsien von 5 Patienten.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die FISH als ergänzende Methode in der mikrobiologischen Diagnostik insbesondere bei IE und HIS geeignet ist. In prospektiven klinischen Studien muss nun überprüft werden, inwieweit dadurch das Management dieser Krankheitsbilder verbessert werden kann. Die FISH als Verbindung zwischen histopathologischen und molekularbiologischen Techniken könnte auch in weiteren Bereichen der medizinischen Mikrobiologie vorteilhaft sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind publiziert in:

1. Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D et al. **Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures.** Int J Antimicrob Agents 2008; S32: S51 – 59
2. Mallmann C, Siemoneit S, Schmiedel D et al. **Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study.** Clin Microbiol Infect 2010; 16: 767 – 773
3. Gescher DM, Mallmann C, Kovacevic D et al. **A view on *Bartonella quintana* endocarditis – confirming the molecular diagnosis by fluorescence in situ hybridization.** Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 60: 99 – 103
4. Schmiedel D, Epple HJ, Loddenkemper C et al. **Rapid and accurate Diagnosis of Human Intestinal Spirochetosis by Fluorescence In Situ Hybridization.** J Clin Microbiol 2009; 47: 1393 – 1401

## 1.2. Einleitung

Der Nachweis, die Identifizierung und die Resistenztestung von Mikroorganismen sind die Kernaufgaben der medizinischen Mikrobiologie. Eine der ältesten Methoden der diagnostischen Bakteriologie zur orientierenden Einteilung möglicher Erreger ist die direkte Mikroskopie in Kombination mit verschiedenen Färbungen. Die genaue Identifizierung erfolgt heute in der Regel durch phänotypische Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften nach Anzucht und Isolierung der Mikroorganismen. Die Verwendung automatisierter Systeme ermöglicht ein hohes Maß der Standardisierung und neben der Identifikation auch die Resistenztestung.

Allerdings haben diese kulturbasierten Verfahren u. U. verschiedene Nachteile. Noch nicht kultivierbare Mikroorganismen oder Erreger mit komplexen Wachstumsanforderungen können nicht oder nur schwer identifiziert werden. Insbesondere nach antibiotischer Vorbehandlung bleiben einige klinische Materialien kulturnegativ [Moyad 2008, Syed 2007]. Außerdem ist der diagnostische Ablauf mit einer Dauer von mind. 24, oft jedoch 48 Stunden oder mehr sehr zeitintensiv [Weile 2009]. Des Weiteren fehlt insbesondere bei Gewebeproben der histologische Zusammenhang, sodass eine Differenzierung zwischen pathogenen Erregern und möglichen Kontaminationen schwierig ist.

Durch die Entwicklung immunologischer und molekularbiologischer Techniken stehen inzwischen mehrere kulturunabhängige Verfahren zur Verfügung. Insbesondere die molekularbiologischen Methoden, die eine genotypische Charakterisierung der Erreger mit hoher Sensitivität und Spezifität ermöglichen, werden zunehmend angewandt [Rappuoli 2004, Muldrew 2009]. Eine Technik, die den molekularbiologischen und mikroskopischen Ansatz kombiniert, ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) [Amann 2001, Wagner 2003]. Es handelt sich um ein kulturunabhängiges Verfahren, welches eine direkte Visualisierung und Identifizierung von Mikroorganismen in ihrem histologischen Kontext ermöglicht. Dabei binden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonden an die 16S rRNA der Mikroorganismen, die so genus- oder speziesspezifisch zur Darstellung gebracht werden. Die 16S rRNA wird als Zielmolekül der Hybridisierung gewählt, da es sich um einen phylogenetischen Marker mit konservierten Regionen handelt, der in hoher Kopienanzahl pro Zelle vorliegt [Ludwig 1994]. Die FISH wird insbesondere in den Gebieten der mikrobiellen Ökologie, Biotechnologie und Genetik eingesetzt [Pernthaler 2007, Wienberg 2005]. Im Bereich der medizinischen Mikrobiologie kommt die FISH bisher vor allem experimentell zur Anwendung [Moter 2000], wird aber zunehmend für den klinischen Einsatz bei speziellen Fragestellungen evaluiert

[Forrest 2007]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluation der FISH zur Diagnostik und Erregeridentifizierung bei ausgewählten Krankheitsbildern: bei Sepsis, infektiöser Endokarditis und bei humaner intestinaler Spirochätose.

### **1.3. Evaluation der FISH zur Diagnostik bei septischen Krankheitsbildern**

#### **1.3.1. Identifizierung von Gram-positiven Kokken aus positiven Blutkulturen durch FISH**

Die Sepsis ist ein häufiges intensivmedizinisches Krankheitsbild mit einer Mortalität von 30 – 50%, das ein umgehendes diagnostisches und therapeutisches Handeln erfordert [Dombrovskiy 2007]. Die Zeitspanne bis zur Verabreichung einer adäquaten antimikrobiellen Therapie ist dabei ein entscheidender prognostischer Faktor [Brindley 2006, Kumar 2006]. So konnte gezeigt werden, dass eine initial ineffektive antibiotische Behandlung mit einer fünffach erhöhten Mortalität einhergeht [Kumar 2009]. Der mikrobiologische Goldstandard in der Sepsis-Diagnostik besteht aktuell in der Anzucht von Mikroorganismen in Blutkulturflaschen, die anschließend nach Subkultur biochemisch identifiziert und hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Empfindlichkeit getestet werden. Dieser diagnostische Ablauf ist mit einer Dauer von 24 – 48h nach dem Nachweis von Wachstum in der Blutkulturflasche sehr zeitaufwändig [Klouche 2008]. Daher werden aktuell verschiedene kulturunabhängige Methoden evaluiert, die zur Identifikation von Mikroorganismen direkt aus positiven Blutkulturflaschen ohne vorhergehende Subkultur zur Anwendung kommen könnten. Zu diesen Techniken zählt neben verschiedenen, auf Nukleinsäure-Amplifikation basierenden Verfahren und der direkten biochemischen Identifizierung aus positiven Blutkulturflaschen auch die FISH. Diese wurde bereits erfolgreich zum raschen Nachweis von Mikroorganismen in positiven Blutkulturen angewendet [Kempf 2000, Oliveira 2003, Kempf 2005, Shepard 2008]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die FISH-Sondenkombination zur Identifikation der häufigsten und klinisch relevanten Gram-positiven Kokken als Sepsiserreger zu erweitern und im Vergleich zur klinischen Routinediagnostik auf Proben aus positiven Blutkulturen anzuwenden.

#### **Entwicklung einer FISH-Sondenauswahl zur Sepsisdiagnostik**

Material aus 428 Blutkulturflaschen, in denen nach aerober oder anaerober Bebrütung Gram-positiv Kokken nachgewiesen wurden, wurde verblindet einerseits mit FISH und andererseits

durch Subkultur und anschließende konventionelle biochemische Identifikationsverfahren untersucht. Zur Vervollständigung der zur Verfügung stehenden FISH-Sondenauswahl wurden 3 neue Sonden entwickelt: STREP2, spezifisch für die *S. mitis* – Gruppe und *S. pneumoniae*, ENCO, spezifisch für Enterokokken außer *E. faecalis*, und GRANU, spezifisch für die *Granulicatella*-Gruppe. Für detaillierte Informationen zu Material und Methoden siehe Gescher et al. [2008a].

### **Erregeridentifizierung in 422 von 428 Blutkulturen durch FISH**

Durch die Erweiterung der bereits publizierten Sondenauswahl um die Sonden STREP2, ENCO und GRANU konnte ein diagnostischer Algorithmus mit standardisiertem Ablauf zur Identifizierung der häufigsten Gram-positiven Bakterien in Blutkulturflaschen entworfen werden. In 334 Fällen wurden Staphylokokken nachgewiesen, von denen 73 als *S. aureus* identifiziert wurden. In den übrigen Proben wurden in 49 Fällen Enterokokken, in 25 Fällen Streptokokken und in 2 Fällen *Granulicatella* spp. nachgewiesen. In der Gruppe der Enterokokken konnte in 37 Proben *E. faecalis* und in 10 Proben *E. faecium* / *durans* identifiziert werden. Im Vergleich zu konventionellen mikrobiologischen Identifikationsverfahren bzw. in diskrepanten Fällen zur Sequenzierung der 16S rDNA ergab sich damit eine Sensitivität von 98,7%, eine Spezifität von 99,0%, ein positiver prädiktiver Wert von 98,8% und ein negativer prädiktiver Wert von 98,9%.

Für 16 Proben lag eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der FISH und den Resultaten der konventionellen diagnostischen Methoden vor. Die Sequenzierung der 16S rDNA wurde als Goldstandard zur Identifikation der Mikroorganismen definiert und bestätigte in 10 Fällen das Ergebnis der FISH. Für 6 Proben (1,4% aller untersuchten Proben) erwies sich das Resultat der FISH als falsch.

### **Diskussion der Ergebnisse**

Mit dieser Studie liegt erstmals eine umfassende FISH-Sondenkombination zur Identifizierung der wichtigsten Gram-positiven Kokken als Sepsiserreger vor. Die Mikroorganismen aus 422 von 428 Blutkulturen wurden korrekt durch FISH identifiziert. Die Sensitivität und Spezifität ist mit 98,7% und 99,0% höher als bei konventionellen kulturbasierten Methoden (Goldstandard bei diskrepanten Fällen: Sequenzierung). Der positive und negative prädiktive Wert (98,8% und 98,9%) sind mit den Ergebnissen anderer Studien zur Evaluation der FISH in der Sepsisdiagnostik vergleichbar [Oliveira 2002,

Gonzalez 2004]. Mit einem Zeitaufwand von ca. 3 Stunden kann die Diagnostik um bis zu 48 Stunden beschleunigt werden.

Es existieren bereits verschiedene kommerziell erhältliche FISH-Assays, die allerdings auf Peptidnukleinsäure-Sonden (PNA-Sonden) basieren [Hensley 2009, Peleg 2009, Gherna 2009]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von PNA-FISH-Sonden zur raschen Erregerdifferenzierung aus positiven Blutkulturen mit einer Reduktion von Mortalität und Therapiekosten einhergehen kann [Alexander 2006, Ly 2008, Forrest 2008]. Im Vergleich zu anderen Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen aus positiven Blutkulturen geht die Verwendung einer PNA-FISH jedoch mit relativ hohen Kosten einher [Hermsen 2008]. Die in der vorliegenden Studie angewandte Methode auf der Basis von Oligonukleotid-FISH-Sonden ist im Vergleich zu PNA-Sonden kostengünstig. Eine prospektive klinische Studie unter Verwendung von Oligonukleotid-FISH-Sonden liegt aktuell allerdings nicht vor.

Im Vergleich zu PCR-basierten Verfahren [Gaibani 2009] und zur MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight) Massenspektrometrie [La Scola 2009] ist das Spektrum der Erreger, die durch FISH identifiziert werden können, deutlich eingeschränkt. Zudem ist durch FISH nur eine Identifizierung von Mikroorganismen möglich. Eine Resistenztestung erfordert weiterhin die Anzucht der Erreger, welche jedoch in Kombination mit einer direkten Identifizierung aus positiven Blutkulturen in automatisierten Systemen zurzeit evaluiert wird [Chen 2008, Lupetti 2009]. Dieser Aspekt gewinnt zunehmend an Bedeutung, da insbesondere multiresistente Keime, VRE oder MRSA als Sepsiserreger oft initial inadäquat behandelt werden [Ammerlaan 2009]. Im Bereich der FISH werden aktuell Sondenkombinationen entwickelt, die eine Aussage über die antimikrobielle Empfindlichkeit des Erregers erlauben, z. B. zur Identifizierung von VRE [Kilic 2005] und VISA [Fosheim 2007]. Studien zur klinischen Anwendung dieser Sonden stehen allerdings noch aus.

### 1.3.2. FISH zur mikrobiologischen Diagnostik der infektiösen Endokarditis

Die infektiöse Endokarditis (IE) beschreibt ein lebensbedrohliches Krankheitsbild durch einen infektiösen Streuherd im Bereich der Herzklappen [McDonald 2009]. Die Diagnosestellung ist oft schwierig und basiert daher auf einer Kombination klinischer, echokardiographischer, mikrobiologischer und immunologischer Befunde, die als modifizierte Duke-Kriterien zusammengefasst werden [Li 2000]. Die mikrobiologischen Verfahren beruhen auf dem

Nachweis von Mikroorganismen in Blutkulturen oder in der Kultur resezierter Herzklappen. In 5 – 30% der Fälle gelingt jedoch der mikrobiologische Erregernachweis nicht, was auf eine antibiotische Vorbehandlung oder auf schwer anzüchtbare Erreger wie z. B. *Bartonella* spp., *Coxiella* spp. oder Erreger der HACEK-Gruppe zurückzuführen ist [Naber 2007, Brouqui 2001]. Kulturnegative Verläufe einer IE sind mit einer schlechteren Prognose und einer höheren postoperativen Komplikationsrate verbunden [Murashita 2004] und stellen daher ein diagnostisches und therapeutisches Problem dar.

Aktuell werden verschiedene kulturunabhängige Techniken zur Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik der IE entwickelt und analysiert, insbesondere molekularbiologische [Fenollar 2007] und serologische Methoden [Raoult 2005]. Die FISH hat sich durch die Kombination molekularbiologischer und histologischer Techniken in Einzelfällen bereits als sinnvolle Ergänzung zur Diagnose der IE erwiesen [Gescher 2008b]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die FISH erstmals als diagnostisches Verfahren der IE an 54 resezierten Herzklappen zu evaluieren und mit konventionellen Methoden zu vergleichen.

### **Entwicklung der FISH zur IE-Diagnostik**

Es wurden Herzklappen von 54 Patienten, die sich bei Verdacht einer IE einem kardiochirurgischen Herzklappenersatz unterzogen, verblindet mit FISH und konventionellen diagnostischen Methoden analysiert. Für die FISH wurde die Sondenauswahl verwendet, die zum Nachweis von Gram-positiven Kokken in Blutkulturen evaluiert wurde [Gescher 2008a]. Zusätzlich wurde die Sonde RE-WHIP3 [von Herbay 1996] zur spezifischen Darstellung von *T. whipplei* entworfen und optimiert [Mallmann 2009] und die Sonde BAQU zur Visualisierung von *B. quintana* angewendet [Gescher 2008b]. Für detaillierte Informationen zu Material und Methoden siehe Mallmann et al. [2009].

### **Erregeridentifizierung in 26 von 54 IE-Fällen, darunter 5 kulturnegative Fälle**

Von den 54 untersuchten Herzklappen waren in 26 Fällen Mikroorganismen im Gewebe mittels FISH nachweisbar. In 28 Fällen ergab die FISH ein negatives Ergebnis, welches bei 26 Proben durch eine negative Bakterien-spezifische Konsensus-PCR des 16S rRNA-Gens bestätigt wurde. In den FISH-positiven Herzklappenproben konnte *Streptococcus* spp. (n = 9), *S. mitis/S. pneumoniae* (n = 5), *Staphylococcus* spp. (n = 5), *E. faecalis* (n = 3), *B. quintana* (n = 1) und *T. whipplei* (n = 1) identifiziert werden. In 2 Fällen waren die Mikroorganismen nur mit der Sonde EUB338 zur Darstellung der meisten Bakterien [Amann 1990] positiv.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Blutkulturen konnte die FISH in 10 Fällen einen fraglich positiven Befund der Blutkulturen, d. h. kontaminationsverdächtige Keime oder nicht reproduzierbare Ergebnisse, als IE bestätigen. In 2 Fällen, in denen *E. faecalis* aus Blutkultur und Herzklappenmaterial angezchtet wurde, blieb die FISH negativ. Hingegen konnten in 5 Blutkultur-negativen Fällen Mikroorganismen durch FISH visualisiert werden, darunter *T. whipplei* und *B. quintana* in je einem Fall.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Kultur von den Herzklappenproben wurden 15 von 17 positive Befunde durch die FISH bestätigt. Bei den falsch negativen 2 Herzklappenproben handelte es sich um die o. g. Fälle. Hingegen konnten in 11 von 37 Fällen, in denen die Herzklappenproben kein Wachstum zeigten, Mikroorganismen durch FISH nachgewiesen werden. In 26 Fällen waren FISH und Herzklappenkultur übereinstimmend negativ.

### **Diskussion der Ergebnisse**

Bei molekularbiologischen Verfahren, die zur mikrobiologischen Diagnostik der IE diskutiert werden, wird die pan-bakterielle PCR aus resezierten Herzklappen am häufigsten angewandt. Die Amplifikation bakterieller DNA aus Herzklappen hat sich als sensitives Verfahren insbesondere in kulturnegativen Fällen erwiesen [Marin 2007, Voldstedlund 2008]. Unklar bleibt hier jedoch das Kontaminationsrisiko sowie die Bedeutung persistierender bakterieller DNA über die antibiotische Therapie hinaus [Nomura 2009, Rovey 2005]. Die Anwendung einer pan-bakteriellen PCR direkt aus Blutproben ohne vorangegangene Inkubation könnte sich vor allem bei antibiotischer Vorbehandlung der Patienten als sinnvoll erweisen [Casalta 2009]. Es wird aktuell diskutiert, ob die Aufnahme molekularbiologischer Methoden in die Duke-Kriterien zu einer Verbesserung der Diagnostik der IE führen könnte [Millar 2001, Habib 2009].

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die FISH zur molekularbiologischen Diagnostik der IE evaluiert. Es konnten in 26 von 54 Fällen Mikroorganismen im Herzklappengewebe durch FISH visualisiert und identifiziert werden. Neben den typischen Endokarditis-Erregern wurden mit *B. quintana* und *T. whipplei* auch seltene Spezies nachgewiesen. In 5 von 13 kulturnegativen Fällen konnte durch FISH der verursachende Mikroorganismus identifiziert werden. In 2 kulturpositiven Fällen blieb die FISH negativ, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass der durch FISH untersuchte Anteil der Herzklappenproben nicht am Entzündungsprozess beteiligt war. Wäre die FISH in den Duke-Kriterien berücksichtigt, hätten insgesamt 8 von 18 (44,4%) kulturnegativen Fällen oder Fällen mit möglicher IE als gesicherte IE klassifiziert werden können.

## **1.4. FISH zur Visualisierung von Mikroorganismen *in situ***

### **1.4.1. Darstellung von Erregern der IE *in situ* durch FISH**

Die FISH ermöglicht im Gegensatz zu anderen molekularbiologischen Methoden nicht nur die Identifizierung möglicher Erreger, sondern auch die Visualisierung von Mikroorganismen *in situ*, d. h. innerhalb ihres histologischen Kontextes. Eine Erregerdarstellung im Gewebe bei IE kann auch durch Autoimmunohistochemie unter Verwendung patienteneigener Antikörper erfolgen [Lepidi 2006]. Dabei gelingt jedoch keine Identifizierung der Mikroorganismen.

### **Differenzierung von pathogenen Mikroorganismen und Kontamination**

Es ist mit FISH möglich, histopathologische Informationen zu potentiellen Erregern zu gewinnen. Im Rahmen der Endokarditis-Diagnostik ist dies für jene Erreger von besonderer Bedeutung, die bei Nachweis aus Blutkulturen oder PCR oft als Kontamination interpretiert werden. So wurden neben koagulasenegativen Staphylokokken [Nalmas 2008] auch *Propionibacterium* spp. [Sohail 2009] und *Corynebacterium* spp. [Knox 2002, Belmares 2007] als Erreger einer IE nachgewiesen. In der vorliegenden Studie konnten in 5 Fällen koagulasenegative Staphylokokken in den Herzklappenproben durch FISH visualisiert und als IE diagnostiziert werden.

### **Darstellung organisierter bakterieller Strukturen im Gewebe**

Die gleichzeitige Visualisierung und Identifizierung von Erregern der IE durch FISH ermöglicht die Darstellung komplexer bakterieller Strukturen, die in ihrer organisierten Architektur *in vitro* gewachsenen Biofilmen [O'Toole 2000, Costerton 1999] ähneln. Durch den Nachweis von 16S rRNA durch FISH lassen sich Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Mikroorganismen ziehen. Bei der Visualisierung von Herzklappenproben bei IE fielen Areale mit FISH-positiven Bakterien mit offensichtlich hohem 16S rRNA-Gehalt auf, die sich von FISH-negativen, nur mit einem Nukleinsäurefarbstoff (DAPI) darstellbaren Mikroorganismen abgrenzten. Interessanter Weise finden sich FISH-positive und somit möglicherweise noch lebendige Mikroorganismen auch in Herzklappenproben von Patienten, die präoperativ bereits adäquat antibiotisch behandelt wurden. Insgesamt unterstützen diese mikroskopischen Informationen die Hypothese, dass es sich bei der IE um eine Biofilm-Erkrankung handeln könnte [Musci 2010]. Insbesondere der mikroskopische Aspekt von organisierten bakteriellen Strukturen, die therapierefraktären klinischen Verläufe sowie die hohen Anzahl kulturnegativer Fälle von IE scheinen den vorgeschlagenen Kriterien von

Parsek und Singh [2003] bzw. Hall-Stoodley und Stoodley [2009] zur Definition einer Biofilm-Erkrankung zu entsprechen. Aus dieser Hypothese könnten sich neue therapeutische Ansätze ergeben, die gezielt die Biofilm-Ausbildung bekämpfen [Høiby 2010, Rasmussen 2006]. Zur Klärung dieser Aspekte sind weitere Studien erforderlich, bei denen die FISH eine wichtige Methode zur Untersuchung pathogenetischer Aspekte darstellen kann.

#### 1.4.2. Mikrobiologische Diagnose der humanen intestinalen Spirochätose durch FISH

Bei der humanen intestinalen Spirochätose (HIS) kommt es zum Befall des distalen Gastrointestinaltrakts durch Spirochäten des Genus *Brachyspira*, insbesondere *B. aalborgi* und *B. pilosicoli* [Harland 1967]. Dies kann zu anhaltenden gastrointestinalen Beschwerden wie chronischer Diarrhö führen [Ena 2009]. In Risikogruppen wie bei immunsupprimierten oder HIV-infizierten Patienten wurde eine Prävalenz von 12% festgestellt [Peruzzi 2007]. Die epidemiologischen Daten sind allerdings auf Grund der schwierigen Diagnostik lückenhaft. Da für die Anzucht von *Brachyspira* spp. eine anaerobe Bebrütung auf Selektivnährmedium von bis zu 6 Wochen nötig ist, werden sie in der Routinediagnostik in der Regel nicht nachgewiesen. Bei der histopathologischen Untersuchung fallen die Spirochäten an der Oberfläche von Darmbiopsien in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) als blauer Saum auf. Die Diagnosestellung auf dieser Basis erfordert jedoch viel Erfahrung des Untersuchenden und erlaubt darüber hinaus keine Identifikation der Mikroorganismen. In verschiedenen Arbeiten gelang bereits die Visualisierung intestinaler Spirochäten durch FISH [Boye 1998, Jensen 2001]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf der Grundlage vorangehender phylogenetischer Untersuchungen eine *Brachyspira*-genusspezifische FISH-Sonde zu entwickeln, welche in einem diagnostischen Screening-Verfahren eingesetzt werden kann. Mit Hilfe dieser Sonde wurde in fünf Fällen die Diagnose einer HIS gestellt.

#### **Entwicklung der FISH-Sonde BRACHY**

Bei fünf Patienten mit chronischen gastrointestinalen Beschwerden wurden im Rahmen der differentialdiagnostischen Abklärung Darmbiopsien entnommen. Aufgrund histopathologischer Veränderungen wurde die Verdachtsdiagnose einer HIS gestellt. In 3 Fällen gelang eine Anzucht von *Brachyspira* auf Selektivmedium. Es erfolgte eine PCR-Amplifikation und Sequenzierung der 16S rDNA aus den Darmbiopsien bzw. *Brachyspira*-Isolaten zur phylogenetischen Einordnung der beteiligten Stämme. Auf der Basis dieser Daten

sowie unter Verwendung verfügbarer Sequenzen in EMBL und Gen Bank wurde die FISH-Sonde BRACHY zur spezifischen Visualisierung von *Brachyspira* spp. entwickelt und auf Schnitte der Darmbiopsien angewendet. Für detaillierte Informationen zu Material und Methoden siehe Schmiedel et al. [2009].

### **Phylogenetische Analyse der *Brachyspira* 16S rDNA**

Die Sequenzen der 16S rDNA aus dem Biopsiematerial der Patienten HIS1 und HIS2 zeigten die höchste Homologie mit *B. aalborgi* AF200603 und fielen dementsprechend in der phylogenetischen Darstellung in die Gruppe von *B. aalborgi* 513A<sup>T</sup>. Die Sequenzen der Patienten HIS3 – HIS5 zeigten bei einer Differenz in 7 – 8 Nukleotidpositionen die höchste Homologie mit *B. pilosicoli* P43<sup>T</sup>, bildeten jedoch in der phylogenetischen Darstellung einen separaten Zweig in der *B. pilosicoli*-Gruppe. Die Sequenzen unterschieden sich untereinander nur in 3 – 5 Nukleotidpositionen, obwohl die Isolate von 3 Patienten aus verschiedenen deutschen Städten stammten.

### **Darstellung von *Brachyspira* spp. durch FISH *in situ***

Die FISH-Sonde BRACHY wurde nach Einstellung optimaler Hybridisierungsbedingungen an verschiedenen Kontrollstämmen getestet. In der Anwendung auf die Darmbiopsien zeigte sich in geringer Vergrößerung (x100) ein helles, bandförmiges Fluoreszenzsignal entlang der luminalen Seite der Epithelzellen. Unter starker Vergrößerung (x1000) wurden zahlreiche, mit einem Ende an die Mukosa angeheftete Spirochäten sichtbar, die durch das positive Signal mit BRACHY als *Brachyspira* spp. identifiziert werden konnten. Zusätzlich zu der gewöhnlichen Schraubenform konnten auch atypische Morphologien dargestellt werden.

### **Diskussion der Ergebnisse**

Beim Menschen ist bisher ungeklärt, ob und bei welchen Spirochäten der Gattung *Brachyspira* es sich um harmlose Kommensalen, Opportunisten oder Pathogene handelt. Durch die unzureichenden diagnostischen Routinemethoden, bei denen die Spirochäten nicht detektiert werden, bleiben vermutlich viele Fälle unentdeckt. Daher ist die Datenlage zur Phylogenie und Epidemiologie von *Brachyspira* mangelhaft.

In dieser Studie wurde eine *Brachyspira*-genusspezifische FISH-Sonde entwickelt und erfolgreich in 5 Fällen zur Darstellung und Identifikation von *Brachyspira* spp. angewendet. Die Fluoreszenz-Signale waren offensichtlich und auch in geringer Vergrößerung klar erkennbar. Des Weiteren konnten atypisch geformte Spirochäten in Darmlumen als

*Brachyspira* spp. identifiziert werden. Die FISH ist daher vermutlich den histopathologischen Methoden zur Diagnose der HIS überlegen, was allerdings erst in einer größeren Studie mit entsprechenden Kontrollgruppen überprüft werden muss.

Die FISH mit der *Brachyspira*-genusspezifischen Sonde kann nur als Screening-Methode dienen. Bei Nachweis einer HIS sollten die Spirochäten mit speziesspezifischen Sonden [Jensen 2001] oder Sequenzierung genauer differenziert werden. Die phylogenetische Analyse der untersuchten Fälle zeigt in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Studien [Jensen 2004], dass die humanen *Brachyspira* spp. Unterschiede in ihrer 16S rDNA zeigen. Die *Brachyspira*-Sequenzen der Patienten HIS3 – HIS5 waren untereinander sehr ähnlich, zeigten aber Unterschiede zu bisher bekannten Phylotypen und bildeten dementsprechend einen separaten Zweig in der *B. pilosicoli*-Gruppe. Weitere Studien zur Epidemiologie und Einschätzung der phylogenetischen Vielfalt der *Brachyspira* spp. sind als Grundlage für die Entwicklung und Evaluation diagnostischer Methoden und zur Einordnung der pathogenetischen Relevanz der *Brachyspira* spp. dringend erforderlich.

## 1.5. Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass sich die FISH bei verschiedenen klinischen Fragestellungen erfolgreich anwenden lässt. Es gelang die Darstellung von Mikroorganismen sowohl in flüssigen Proben wie Blut als auch in fixiertem Gewebe zur Visualisierung komplexer bakterieller Strukturen in ihrem histologischen Kontext. In der Diagnostik von septischen Krankheitsbildern scheint die routinemäßige Anwendung der FISH zur Identifizierung von Erregern aus positiven Blutkulturflaschen im Vergleich zu anderen aktuell evaluierten Verfahren ungewiss. Dagegen bietet die FISH von Gewebsschnitten zusätzlich eine räumliche Auflösung und somit einen Einblick in das Infektionsgeschehen und -pathogenese *in situ*. So kann die FISH ein sinnvolles ergänzendes Verfahren zur Diagnostik der IE insbesondere in fraglichen oder kulturnegativen Fällen darstellen. Weitere Studien sind erforderlich, um die Bedeutung der FISH für das Management der IE einzuschätzen. In der Diagnostik der HIS hat sich die FISH als vorteilhaft erwiesen, so dass ein klinischer Einsatz als Screening-Methode für exakte Diagnosestellung und zur Ergänzung fehlender epidemiologischer Daten denkbar ist. Die FISH stellt durch die gleichzeitige Visualisierung und Identifizierung von Mikroorganismen *in situ* eine Verbindung zwischen histopathologischen und molekularbiologischen Techniken dar und kann in weiteren Bereichen der medizinischen Mikrobiologie eine wertvolle Methode zur raschen und exakten Erregeridentifikation sein.

## 1.6. Literaturverzeichnis

1. **Alexander BD, Ashley ED, Reller LB, Reed SD.** Cost savings with the implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 277 – 282
2. **Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA.** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 1990; 43: 1947 – 1949
3. **Amann R, Fuchs BM, Behrens S.** The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12: 231 – 236
4. **Ammerlaan H, Seifert H, Harbarth S et al.** Adequacy of antimicrobial treatment and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia in 9 Western European countries. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 997 – 1005
5. **Belmares J, Detterline S, Pak JB, Parada JP.** *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcome. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 4
6. **Boye M, Jensen TK, Møller K, Leser TD, Jorsal SE.** Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA in situ hybridization. *Mol Cell Probes* 1998; 12: 323 – 330
7. **Brindley PG, Zhu N, Sligl W.** Best evidence in critical care medicine: Early antibiotics and survival from septic shock: it's about time. *Can J Anaesth* 2006; 53: 1157 – 1160
8. **Brouqui P, Raoult D.** Endocarditis due to rare or fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 177 – 207
9. **Casalta JP, Gouriet F, Roux V, Thuny F, Habib G, Raoult D.** Evaluation of the LightCycler® SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic in infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 569 – 573
10. **Chen JR, Lee SY, Yang BH, Lu JJ.** Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive BacT/ALERT blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect* 2008; 41: 259 – 264
11. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318 – 1322

12. **Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL.** Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35: 1244 – 1250
13. **Ena J, Simon-Aylon A, Pasquau F.** Intestinal spirochetosis as a cause of chronic diarrhoea in patients with HIV infection: case report and review of the literature. *Int J STD AIDS* 2009; 20: 803 – 805
14. **Fenollar F, Raoult D.** Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30S: S7 – 15
15. **Forrest GN.** PNA FISH: present and future impact on patient management. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7: 231 – 236
16. **Forrest GN, Roghmann MC, Toombs LS et al.** Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization for hospital-acquired enterococcal bacteremia: delivering earlier affective antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3558 – 3563
17. **Fosheim GE, Carey RB, Limbago BM.** Evaluation of the AdvanDx VRE EVIGENE assay for detection of vanA in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1611 – 1613
18. **Gaibani P, Rossini G, Ambretti S et al.** Blood culture systems: rapid detection—how and why? *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: S13 – 15
19. **Gescher DM, Kovacevic D, Schmiedel D et al.** Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. *Int J Antimicrob Agents* 2008; S32: S51 – 59
20. **Gescher DM, Mallmann C, Kovacevic D et al.** A view on *Bartonella quintana* endocarditis – confirming the molecular diagnosis by fluorescence in situ hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 99 – 103
21. **Gherna M, Merz WG.** Identification of *Candida albicans* and *Candida glabrata* within 1.5 hours directly from positive blood culture bottles with a shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization protocol. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 247 – 248
22. **Gonzalez V, Padilla E, Gimenez M et al.** Rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia using *S. aureus* PNA FISH. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 396 – 398
23. **Habib G, Hoen B, Tornos P et al.** Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the

- Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2009; 30: 2369 – 2413
24. **Hall-Stoodley L, Stoodley P.** Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; 11: 1034 – 1043
  25. **Harland WA, Lee FD.** Intestinal spirochaetosis. *Br Med J* 1967; 3: 718 – 719
  26. **Hensley DM, Tapia R, Encina Y.** An evaluation of the advandx *Staphylococcus aureus*/CNS PNA FISH assay. *Clin Lab Sci* 2009; 22: 30 – 33
  27. **Hermesen ED, Shull SS, Klepser DG et al.** Pharmacoeconomic analysis of microbiologic techniques for differentiating staphylococci directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2924 – 2929
  28. **Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O.** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 322 – 323
  29. **Jensen TK, Boye M, Ahrens P, et al.** Diagnostic examination of human intestinal spirochetosis by fluorescent in situ hybridization for *Brachyspira aalborgi*, *Brachyspira pilosicoli*, and other species of the genus *Brachyspira* (*Serpulina*). *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4111 – 4118
  30. **Jensen TK, Teglbjærg PS, Lindboe CF, Boye M.** Demonstration of *Brachyspira aalborgi* lineages 2 and 3 in human colonic biopsies with intestinal spirochaetosis by specific fluorescent in situ hybridization. *J Med Microbiol* 2004; 53: 341 – 343
  31. **Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB.** Rapid detection and identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 830 – 838
  32. **Kempf VA, Mandle T, Schumacher U, Schäfer A, Autenrieth IB.** Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 47 – 55
  33. **Kilic A, Baysallar M, Bahar G, Kucukkaraaslan A, Cilli F, Doganci L.** Evaluation of the ENVIGENE VRE detection kit for detection of vanA and vanB genes in vancomycin-resistant enterococci. *J Med Microbiol* 2005; 54: 347 – 350
  34. **Klouche M, Schröder U.** Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 888 – 908
  35. **Knox KL, Holmes AH.** Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 97 – 99

36. **Kumar A, Roberts D, Wood KE et al.** Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589 – 1596
37. **Kumar A, Ellis P, Arabi Y et al.** Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009; 136: 1237 – 1248
38. **La Scola B, Raoult D.** Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009; 4: e8041
39. **Lepidi H, Coulibaly B, Casalta JP, Raoult D.** Autoimmunohistochemistry: A New Method for the Histologic Diagnosis of Infective Endocarditis. *J Infect Dis* 2006; 193: 1711 – 1717
40. **Li JS, Sexton DJ, Mick N et al.** Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 633 – 638
41. **Ludwig W, Schleifer KH.** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 15: 155 – 173
42. **Lupetti A, Barini S, Castagna B, Nibbering PH, Campa M.** Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-positive cocci in blood cultures by direct inoculation into the BD Phoenix system. *Clin Microbiol Infect* 2009; 16: 986 – 991
43. **Ly T, Gulia J, Pyrgos V, Waga M, Shoham S.** 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* 2008; 4: 637 – 6400
44. **Mallmann C, Siemoneit S, Schmiedel D et al.** Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study. *Clin Microbiol Infect* 2009; 16: 767 - 773
45. **Marin M, Munoz P, Sanchez M et al.** Molecular Diagnosis of Infective Endocarditis by Real-Time Broad-Range Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sequencing Directly from Heart Valve Tissue. *Medicine* 2007; 86: 195 – 202
46. **McDonald JR.** Acute infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23: 643 – 664
47. **Millar B, Moore J, Mallon P et al.** Molecular diagnosis of infected endocarditis – a new Duke’s criterion. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 673 – 680

48. **Moter A, Göbel UB.** Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000; 41: 85 – 112
49. **Moyad TF, Thornhill T, Estok D.** Evaluation and management of the infected total hip or knee. *Orthopedics* 2008; 31: 581 – 588
50. **Muldrew KL.** Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21: 102 – 111
51. **Murashita T, Sugiki H, Kamikubo Y, Yasuda K.** Surgical results for active endocarditis with prosthetic valve replacement: impact of culture-negative endocarditis on early and late outcomes. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 26: 1104 – 1111
52. **Musci M, Mallmann C, Petrich A et al.** Endocarditis: A Biofilm Disease? 2010, *submitted*
53. **Naber CK, Erbel R.** Infective endocarditis with negative blood cultures. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30S: S32 – 36
54. **Nalmas S, Bishburg E, Meurillio J, Khoobiar S, Cohen M.** Staphylococcus capitis prosthetic valve endocarditis: report of two rare cases and review of literature. *Heart Lung* 2008; 37:380 – 384
55. **Nomura R, Nakano K, Nemoto H et al.** Molecular analyses of bacterial DNA in extirpated heart valves from patients with infective endocarditis. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 43 – 49
56. **Oliveira K, Procop GW, Wilson D, Coull J, Stender H.** Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 247 – 251
57. **Oliveira K, Brecher SM, Durbin A et al.** Direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 889 – 891
58. **O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R.** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49 – 79
59. **Parsek MR, Singh PK.** Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57: 677 – 701
60. **Peleg AY, Tilahun Y, Fiandaca FJ et al.** Utility of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 830 – 832
61. **Pernthaler A, Pernthaler J.** Fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microbes. *Methods Mol Biol* 2007; 353: 153 – 164

62. **Peruzzi S, Gorrini C, Piccolo G, Calderaro A, Dettori G, Chezzi C.** Human intestinal spirochetosis in Parma: a focus on a selected population during 2002 – 2005. *Acta Biomed* 2007; 78: 128 – 132
63. **Raoult D, Casalta JP, Richet H et al.** Contribution of systematic serological testing in diagnosis of infective endocarditis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5238 – 5242
64. **Rappuoli R.** From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat Med* 2004; 10: 1177 – 1185
65. **Rasmussen TB, Givskov M.** Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 149 – 161
66. **Rovero C, Greub G, Leipidi H et al.** PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 163 – 67
67. **Schmiedel D, Epple HJ, Loddenkemper C et al.** Rapid and accurate Diagnosis of Human Intestinal Spirochetosis by Fluorescence In Situ Hybridization. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1393 – 1401
68. **Shepard JR, Addison RM, Alexander BD et al.** Multicenter evaluation of the *Candida albicans* / *Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 50 – 55
69. **Sohail MR, Gray AL, Baddour LM, Tleyjeh IM, Virk A.** Infective endocarditis due to Propionibacterium species. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 387 – 394
70. **Syed FF, Millar BC, Prendergast BD.** Molecular technology in context: a current review of diagnosis and management of infective endocarditis. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 50: 181 – 197
71. **Voldstedlund M, Nørum Pedersen L, Baandrup U, Klaaborg KE, Fuursted K.** Broad-range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis. *APMIS* 2008; 116: 190 – 198
72. **von Herbay A, Ditton HJ, Maiwald M.** Diagnostic application of a polymerase chain reaction assay for the Whipple's disease bacterium to intestinal biopsies. *Gastroenterology* 1996; 10: 1735 – 1743
73. **Wagner M, Horn M, Daims H.** Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 302 – 309
74. **Weile J, Knabbe C.** Current applications and future trend of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 731 – 742

75. **Wienberg J.** Fluorescence in situ hybridization to chromosomes as a tool to understand human and primate genome evolution. *Cytogenet Genome Res* 2005; 108: 139 – 160

## 2. Erklärung über den Anteil an den Publikationen

Hiermit erkläre ich folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen und den damit verbundenen Forschungsarbeiten:

- 1.) 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

**Anteil der Promovendin:** 15%

**Impact factor:** 3,067 (IF JCR Science Edition 2008)

**Beitrag im Einzelnen:**

- Diskussion des Studiendesigns
- Optimierung und Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an Blutkulturproben zur Identifizierung von *Streptococcus* spp.
- Diskussion und Interpretation der Daten
- Durchführung von Korrekturarbeiten am Manuskript

- 2.) Mallmann C, Siemoneit S, **Schmiedel D**, Petrich A, Gescher DM, Halle E, Musci M, Hetzer R, Göbel UB, Moter A. Fluorescence *in situ* hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 767 – 773

**Anteil der Promovendin:** 15%

**Impact factor:** 4,014 (IF JCR Science Edition 2009)

**Beitrag im Einzelnen:**

- Sammlung und Aufarbeitung klinischer Proben
- Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an ausgewählten Herzklappenproben
- Diskussion und Interpretation der Daten
- Durchführung von Korrekturarbeiten am Manuskript

- 3.) 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 fluorescence in situ hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 99 – 103

**Anteil der Promovendin:** 20%

**Impact factor:** 2,139 (IF JCR Science Edition 2008)

**Beitrag im Einzelnen:**

- Erhebung der Patientendaten
- Anzucht der Kontrollstämme
- teilweise Durchführung der Versuche
- Erstellung und Aufbereitung der Graphiken

- 4.) **Schmiedel D**, Epple HJ, Loddenkemper C, Ignatius R, Wagner J, Hammer B, Petrich A, Stein H, Göbel UB, Schneider T, Moter A. Rapid and Accurate Diagnosis of Human Intestinal Spirochetosis by Fluorescence in situ Hybridization. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1393 – 1401

**Anteil der Promovendin:** 60%

**Impact factor:** 4,162 (IF JCR Science Edition 2009)

**Beitrag im Einzelnen:**

- in Zusammenarbeit mit Dr. Moter Planung und Koordination der Studie
- Erhebung der Patientendaten
- Sammlung und Aufarbeitung der klinischen Proben
- Design, Evaluation und Optimierung der Sonde BRACHY inkl. Austestung von Positiv- und Negativkontrollen
- Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an den klinischen Proben und Bilddokumentation
- Entwurf und Verfassen des Manuskripts inkl. Literatursuche und Erstellung von Tabellen, Graphiken und Abbildungen
- Koordination und Durchführung von Korrekturarbeiten am Manuskript

## **4. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 5. Publikationsliste

- 1.) 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; S32: S51 – 59
- 2.) 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 fluorescence in situ hybridization.** Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 60: 99 – 103
- 3.) Schmiedel D, Epple HJ, Loddenkemper C, Ignatius R, Wagner J, Hammer B, Petrich A, Stein H, Göbel UB, Schneider T, Moter A. **Rapid and accurate Diagnosis of Human Intestinal Spirochetosis by Fluorescence In Situ Hybridization.** J Clin Microbiol 2009; 47: 1393 – 1401
- 4.) Mallmann C, Siemoneit S, Schmiedel D, Petrich A, Gescher DM, Halle E, Musci M, Hetzer R, Göbel UB, Moter A. **Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study.** Clin Microbiol Infect 2010; 16: 767 – 773
- 5.) Moter A, Musci M, Schmiedel D. **Molecular Methods for Diagnosis of Infective Endocarditis.** Curr Inf Dis Rep 2010; 12: 244 – 252

### Posterpräsentationen:

- 1.) Schmiedel D, Epple HJ, Loddenkemper C, Ignatius R, Wagner J, Hammer B, Petrich A, Stein H, Göbel UB, Schneider T, Moter A. **Rapid and accurate Diagnosis of Human Intestinal Spirochetosis by Fluorescence in situ Hybridization (FISH).** Gordon Research Conference Biology of Spirochetes 2008, Ventura, CA, USA
- 2.) Schmiedel D, Petrich A, Mallmann C, Rugor K, Musci M, Hetzer R, Göbel UB, Moter A. **Detection of biofilms in infective endocarditis by Fluorescence in situ Hybridization.** 5<sup>th</sup> ASM Conference on Biofilms 2009, Cancun, Mexico

## **6. Erklärung über die Eigenständigkeit**

Ich, Dinah Schmiedel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel „Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden zur direkten Identifizierung und Visualisierung von Mikroorganismen in der klinisch-mikrobiologischen Diagnostik“ selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

## 7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meiner fachlichen Betreuerin und Arbeitsgruppenleiterin Dr. Annette Moter, die in herausragender Weise meine wissenschaftliche Arbeit angeleitet und unterstützt hat.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel, Direktor des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Charité – Universitätsmedizin Berlin, unter dessen Betreuung diese Arbeit entstanden ist.

Ich möchte mich bei den Mitgliedern der AG Moter, insbesondere bei Annett Petrich, Julia Schulze, Tina Fiedler, Angela Pohlisch und Antje Grosse sehr für die technische und organisatorische Unterstützung sowie die herzliche Atmosphäre bedanken. Meinen Promotionskolleginnen und -kollegen danke ich für die angenehme Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre Ermutigungen. Meinem Freund Peter von Schöning danke ich für seine Geduld und seine moralische und informationstechnische Unterstützung. Ich danke meiner Schwester Dr. Judith Schmiedel für ihre stete vertrauensvolle persönliche und wissenschaftliche Unterstützung.