(19) österreichisches patentamt

(10) **AT 503 862 A1 2008-01-15**

(12) Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer: **A 1148/2006**
(22) Anmeldetag: **05.07.2006**
(43) Veröffentlicht am: **15.01.2008**

(51) Int. Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)

(73) Patentanmelder:

AUSTRIAN RESEARCH CENTERS GMBH
- ARC
A-1220 WIEN (AT)

(54) PATHOGEN-IDENTIFIZIERUNG

(57) Offenbart ist ein Verfahren zur Identifizierung von mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen in einer Blutprobe, umfassend die folgenden Schritte:
a) Vorsehen einer Blutprobe,
b) Lysieren der mikrobiellen Pathogene und Durchführen einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA, wobei oder worauf die amplifizierten Nukleinsäuren markiert werden,
c) Kontaktieren der markierten amplifizierten Nukleinsäuren aus Schritt b) mit einem Mikroarray umfassend immobilisierte Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA auf definierten Bereichen auf der Oberfläche des Mikroarrays,
d) Nachweisen der Bindung von einer oder mehr Art(en) der markierten amplifizierten Nukleinsäuren an eine Sonde durch Nachweisen einer markierten amplifizierten Nukleinsäure, die spezifisch an den Mikroarray gebunden ist, und
e) Identifizieren eines mikrobiellen Pathogens von Blutstrominfektionen in der Blutprobe durch Korrelieren der nachgewiesenen Bindung der markierten amplifizierten Nukleinsäuren mit den definierten Bereichen der immobilisierten Sonden für 16S-oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA.

AT 503 862 A1 2008-01-15

010194

Zusammenfassung:

Offenbart ist ein Verfahren zur Identifizierung von mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen in einer Blutprobe, umfassend die folgenden Schritte:
a) Vorsehen einer Blutprobe,
b) Lysieren der mikrobiellen Pathogene und Durchführen einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA, wobei oder worauf die amplifizierten Nukleinsäuren markiert werden,
c) Kontaktieren der markierten amplifizierten Nukleinsäuren aus Schritt b) mit einem Mikroarray umfassend immobilisierte Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA auf definierten Bereichen auf der Oberfläche des Mikroarrays,
d) Nachweisen der Bindung von einer oder mehr Art(en) der markierten amplifizierten Nukleinsäuren an eine Sonde durch Nachweisen einer markierten amplifizierten Nukleinsäure, die spezifisch an den Mikroarray gebunden ist, und
e) Identifizieren eines mikrobiellen Pathogens von Blutstrominfektionen in der Blutprobe durch Korrelieren der nachgewiesenen Bindung der markierten amplifizierten Nukleinsäuren mit den definierten Bereichen der immobilisierten Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA.

NACHGEREICHT

Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung von Pathogenen von Blutstrominfektionen.

Trotz ständiger Fortschritte bei der Diagnose und Frühtherapie von durch Blut übertragenen Infektionen ist die Mortalitätsrate nach wie vor hoch. Traditionelle Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen beruhen auf Blutkulturverfahren, die die Kultivierung von Mikroben mit anschließender morphologischer und physiologischer Charakterisierung voraussetzen (Peters et al., 2004).

Die Häufigkeit des Auftretens von Humanpathogenen wird von verschiedenen Wissenschaftlern und zahlreichen klinischen Forschungsprogrammen regelmäßig kontrolliert. Dabei zeigte sich, dass über 95 % aller Blutstrominfektionen durch nur fünfzehn verschiedene Gattungen verursacht werden. Staphylococcus sp. und Escherichia sp. zeichnen für über 50 % der Infektionen verantwortlich. Diversitätsstudien variierten nur geringfügig zwischen verschiedenen Ländern und Labors. Während die Gesamtinfektionsrate durch Pathogene über die Zeit stabil ist, nehmen vor Allem Pseudomonas-aeruginosa-Infektionen deutlich zu, wobei dies das einzige Pathogen ist, das mit erhöhten Mortalitätsraten in Verbindung gebracht wird (Fluit et al., 2001; Kempf et al., 2000; Shigei et al., 1995; Meremikwu et al., 2005; Vincent et al., 2006).

Die ersten Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Bakterien bei Blutstrominfektionen beruhten auf dem Aufstreichen von Vollblut auf festes Kulturmedium, der Inkubation und anschließenden Auswertung durch Zählung der koloniebildenden Einheiten (CFU). Von Patienten mit Staphylococcus- und Streptococcus-Infektionen isolierte Kulturen enthielten bis zu 100 CFU pro ml Blut, wohingegen weit über 1000 CFU/ml E.-coli-Bakterien gezählt wurden. Ähnliche Mengen waren bei anderen Gram-negativen Bakterien (Yagupsky et al., 1990; Henry et al., 1983) zu finden.

In jüngeren, sich auf Molekulartechnologien stützenden Publikationen wurde behauptet, dass die Bakterienzahl höher sein kann als ursprünglich angenommen. Die quantitative RT-PCR wurde in erster Linie zur Erstellung von Standardkurven von Bakterienmengen in Vollblut zur anschließenden Bestimmung der Bakterienbelastung in klinischen Proben verwendet. Es wurde gefunden, dass die Dichte in Blut für Streptococcus pneumonia bei 10^4 bis $5,4 \times 10^5$ Bakterien pro ml liegt. Andere Gram-positive oder -nega-

NACHGEREICHT

tive Mikroorganismen wurden bei Bakteriämie-Patienten in einem Ausmaß von 10^4 bis 10^7 pro ml nachgewiesen. Hackett wies sogar eine Konzentrationsspitze in schweren Fällen von Septikämie bis zu einem Maximum von $1,8x10^9$ Bakterien pro ml nach (Hackett et al., 2002; van Haeften et al., 2003; Massi et al., 2005,). Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen Kultivierungs- und Molekularmethoden liegt in der Unfähigkeit mancher Mikroorganismen, sich unter Standard-Kultivierungsbedingungen zu vervielfachen (Keer and Birch, 2003). Weiters enthalten auf DNA-Detektion basierende Verfahren auch das unverdaute Genom von toten oder statischen Bakterien (Nogva et al., 2000; Nikkari et al., 2001).

Automatisierte Blutkultursysteme wie BacT/Alert und BACTEC940 stellen Standard-Kultivierungstechniken in der modernen klinischen Praxis dar. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass es aufgrund von ungeeigneten Wachstumsbedingungen immer wieder zu falsch negativen Ergebnissen kommt. Blutkulturen ohne nachweisbares Mikrobenwachstum wurden weiter behandelt, und dann wurden je nach Detektionsverfahren positive Ergebnisse bei 3 bis 40 % der Fälle erhalten (Shigei et al., 1995; Kocoglu et al., 2005; Karahan et al., 2006). Heininger et al. (1999) zeigten den Vorteil des PCR-Nachweises bei einer vorangegangenen Antibiotikabehandlung in einem Rattenmodell auf. Die Nachweisrate von klassischen Blutkulturen sank innerhalb von 25 min nach der intravenösen Verabreichung von Cefotaxim auf 10 % ab, während die PCR-Nachweisrate zu diesem Zeitpunkt immer noch 100 % betrug.

Die Kultivierung von Hefen erfolgt routinemäßig in eigenen Kulturflaschen. Die angebotenen Systeme arbeiten mit einer Empfindlichkeit von 100 % bei Verwendung zum Nachweis von Candida-Infektionen (Horvath et al., 2004).

Herkömmliche Diagnoseverfahren dauern mindestens 24 Stunden aufgrund des dabei notwendigen Mikrobenwachstums. Im Allgemeinen sind der Nachweis und die Identifizierung ein langwieriger Prozess, der bei den meisten Organismen üblicherweise zwischen 2 und 5 Tage oder bei anspruchsvollen Organismen sogar noch länger dauert (Marlowe et al., 2003; Reimer et al., 1997; Henry et al., 1983). Im Gegensatz dazu erfüllen Verfahren auf DNA-Basis den Anspruch einer raschen, zuverlässigen und dabei lebenserhaltenden Diagnose (Belgrader et al., 1999; Vincent und Abraham 2006). Diese Verfahren ließen sich jedoch bisher nicht für die auf dem vorliegenden Gebiet der Blutdiagnose erforderliche Spezifität

NACHGEREICHT

und Sensitivität adaptieren.

Rivers et al. (2005) unterstrichen die Bedeutung einer frühen Behandlung innerhalb von sechs Stunden nach den ersten Symptomen von Bakteriämie auf einer Intensivstation (ITS), also vor dem Übergang von Sepsis zu schwerer Sepsis. Es wird erwartet, dass die derzeitigen, konventionellen mikrobiologischen Verfahren zum Nachweis von Blutstrominfektionen durch molekulare Untersuchungen ersetzt werden. Auf PCR-Amplifikation und anschließende Hybridisierung von fluoreszierenden Sonden basierende Verfahren scheinen die meistversprechendsten Ansätze zu sein (Peters et al., 2004). Verschiedene molekulare Methoden einschließlich der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Sonden wurden für den Nachweis von klinischen Pathogenen adaptiert. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), PCR, Echtzeit-PCR, PCR-Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP) auf Fluoreszenzbasis und Oligonukleotid-Mikroarrays werden zur Identifizierung von Mikroorganismen aus Bakteriämie-Patienten verwendet, enthalten jedoch immer noch einen Schritt zur Bakterienanreicherung auf Kultivationsbasis (Kempf V.A.J. et al., (2000); Peters et al., 2006; Mothershed E.A. and Whitney A.M. (2006); Rantakokko-Jalava (2000); Turenne C.Y. et al., (2000); Aoki S. et al., (2003); Martineau F. et al., (2001); Yadaf A.K. et al., (2005); Lehner A. et al., (2005); Shang S., et al., (2005)).

Die Mikroarray-Technologie wurde als wirksames Werkzeug für verschiedene klinische Anwendungen wie die Pathogen-Identifizierung von Harntraktinfektionen (UTI), akuten Infektionen der oberen Atemwege, parodontalen Pathogenen und menschlichen Darmbakterien beschrieben. Mikroarrays werden außerdem zur Analyse von mikrobieller Genexpression und -diversität verwendet (Bryant et al., 2004; Kato-Maeda et al., 2001; Wang et al., 2002; Roth et al., 2004; Yu et al., 2004).

Zusammenfassend basieren herkömmliche Identifizierungsverfahren für Mikroorganismen im klinischen Alltag üblicherweise auf einer zeitaufwendigen Kultivierung mit anschließender morphologischer und physiologischer Charakterisierung. Blutkulturverfahren sind der goldene Standard bei der Diagnose von hämatogenen Mikrobeninfektionen. Eine frühe Identifizierung von Infektionen verursachenden Mikroben ist aber die entscheidende Voraussetzung für eine schnelle und optimal zielgerichtete Behandlung von Infektionen. Leider dauern diese herkömmlichen Dia-

NACHGEREICHT

gnoseverfahren jedoch mindestens 24 Stunden aufgrund der erforderlichen Mikrobenanreicherung.

Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine rasche, aber nichtsdestoweniger verlässliche Untersuchung auf Pathogene von Blutstrominfektionen zur Verfügung zu stellen, insbesondere Pathogene, die mit humaner Sepsis in Verbindung oder in Zusammenhang stehen (oder vermeintlich in Verbindung stehen). Darüber hinaus besteht der Bedarf nach einem Verfahren, mit dem - auch vorzugsweise mittels Fast-Track - zwischen nahe verwandten, aber pathologisch oder physiologisch unterschiedlichen Arten oder Typen von Organismen unterschieden werden kann.

Demgemäß schafft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen in einer Blutprobe, umfassend die folgenden Schritte:
a) Vorsehen einer Blutprobe (die im Verdacht steht, solche mikrobiellen Pathogene zu enthalten),
b) Lysieren der mikrobiellen Pathogene (wenn vorhanden) und Durchführen einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA, wobei oder worauf die amplifizierten Nukleinsäuren markiert werden,
c) Kontaktieren der markierten amplifizierten Nukleinsäuren aus Schritt b) mit einem Mikroarray umfassend immobilisierte Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA auf definierten Bereichen auf der Oberfläche des Mikroarrays,
d) Nachweisen der Bindung von einer oder mehr Art(en) der markierten amplifizierten Nukleinsäuren an eine Sonde durch Nachweisen einer markierten amplifizierten Nukleinsäure, die spezifisch an den Mikroarray gebunden ist, und
e) Identifizieren eines mikrobiellen Pathogens von Blutstrominfektionen in der Blutprobe durch Korrelieren der nachgewiesenen Bindung der markierten amplifizierten Nukleinsäuren mit den definierten Bereichen der immobilisierten Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA.

Mit der vorliegenden Erfindung wird ein molekularer Ansatz zur raschen Identifizierung von infektiösen Pathogenen in Blut zur Verfügung gestellt, der Nukleinsäure-Amplifikation mit Mikroarray-Detektion kombiniert. Der erfindungsgemäße DNA-Chip umfasst Oligonukleotid-Einfangsonden für die relevanten Pathogene

NACHGEREICHT

von humanem Blutstrom, beispielsweise, wie im Beispielteil vorgesehen, als voll entwickelter und industriell anwendbarer Mikrochip 25 verschiedene Pathogene einschließlich Gram-positiver Kokken, verschiedener Gattungen der Familie der Enterobacteriaceae, Non-Fermenter und klinisch relevanter Candida-Arten.

Durch den Einsatz des erfindungsgemäßen Mikroarrays ist der Nachweis von Mikroorganismen in einem kurzen Zeitrahmen, z.B. innerhalb von 6 Stunden, möglich, was wiederum eine rasche Diagnose von Pathogenen aus dem Blut infizierter Patienten hinsichtlich Gattung und Art gestattet und wichtige Schlussfolgerungen bezüglich Antibiotikabehandlungen zulässt. Die rasche Diagnose einer Bakterieninfektion beschleunigt die Behandlung und verringert den Pflegeaufwand. Die Sensitivität des Verfahrens ist hoch, und es zeigte sich, dass sie je nach Erregerart auf 10 Bakterien pro ml Vollblut reduziert ist.

Vorzugsweise erfolgt die Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA mittels PCR. Die Amplifikationsreaktion kann z.B. mittels Multiplex-PCR durchgeführt werden, doch erwies sich erfindungsgemäß eine Reduktion der Primer-Anzahl für die Nukleinsäure-Amplifikation als vorteilhaft. Daher wird die Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA beim erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise mit universellen Primern für die für 16S- oder 18S-rRNA codierende mikrobielle DNA, vorzugsweise mit nicht mehr als acht Primern (4 Forward-, 4 Reverse-Primern), noch bevorzugter mit nicht mehr als sechs Primern (3 Forward-, 3 Reverse-Primern), vorzugsweise mit nicht mehr als vier Primern (2 Forward-, 2 Reverse-Primern), durchgeführt. Die Primer gemäß Seq. ID Nos. 1, 2, 4 und 5 erwiesen sich als besonders geeignet für das vorliegende Verfahren.

Als Blutprobe kann jede Probe aus Patienten mit einem Verdacht auf Blutstrom-Pathogene verwendet werden, so auch Proben aus aufbereiteten Blutpräparationen wie Blutfraktionen, Blutderivaten oder Blutprodukten. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird besonders bevorzugt ein anfänglicher Filtrationsschritt vor Durchführung der Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion durchgeführt, bei dem die Probe durch ein Filter filtriert wird, das die in der Blutprobe vorhandenen Leukozyten zurückhält, die mikrobiellen Pathogene aber nicht zurückhält. Üblicherweise haben Leukozyten eine Ausschlussgröße von 11 µm (Durchmesser), wohin-

NACHGEREICHT

gegen die meisten (bakteriellen) Pathogene, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert werden sollen, eine Größe von 2 µm aufweisen. Daher ist beispielsweise ein Filter mit einer Ausschlussgröße von 5 bis 10 µm, vorzugsweise 7 µm, absolut geeignet für diesen Filtrationsschritt.

Das bei weitem größte Anwendungsgebiet des vorliegenden Verfahrens ist die Diagnose von Humanblutproben, insbesondere in Verbindung mit Patienten mit Sepsis oder Sepsis-Risiko. Das vorliegende Verfahren eignet sich jedoch genauso gut zur Untersuchung von großen Probenserien, z.B. bei der Untersuchung von Spitalspersonal oder bei Veterinäruntersuchungen (z.B. einer großen Anzahl von Tieren). Vorzugsweise wird die Untersuchung gemäß dem vorliegenden Verfahren jedoch bei der Identifizierung von Humanpathogenen durchgeführt.

Zur Markierung von Nukleinsäuren, insbesondere DNA, während oder nach der Amplifikation stehen dem Fachmann viele Verfahren zur Verfügung. Beispielsweise erfolgt das Markieren der Nukleinsäuren durch Primerverlängerung, in-vitro-Transkription, Biotin-Streptavidin-Markieren, isothermisches Markieren auf Klenow-Fragment-Basis oder direktes Nukleinsäure-Amplifikationsmarkieren, vorzugsweise direktes PCR-Markieren. Das erfindungsgemäß am meisten bevorzugte Markierverfahren ist die Primer verlängerung, vorzugsweise Primerverlängerung unter Verwendung von fluoreszierenden Farben, insbesondere Cy5. Diese bevorzugte Ausführungsform zeigte die beste Sensitivität und Spezifität.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, werden die amplifizierten markierten Nukleinsäuren direkt ohne Reinigungs- oder Waschschritt nach der Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion auf den Mikroarray aufgebracht. Überraschenderweise zeigte die Nicht-Reinigung keine negativen Wirkungen beim Binden der Produkte an den Mikroarray. Vielmehr wird aufgrund der fehlenden weiteren Reinigung der Nukleinsäure vor der Bindung an den Mikroarray ein Produktverlust verhindert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in seinem Versuchsablauf eine DNA-Isolierung aus Blut, Multiplex-PCR, Fluoreszenzmarkierung (Cy5-dCTP) durch einen Primer-Verlängerungsschritt und anschließende Mikroarray-Hybridisierung umfassen.

Vorzugsweise umfasst der erfindungsgemäße Mikroarray immobilisierte Sonden für mikrobielle DNA, die für 16S- oder 18S-rRNA aus mindestens zehn, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere

NACHGEREICHT

mindestens 20, der folgenden mikrobiellen Pathogene von Blutstrominfektionen codiert: Escherichia coli (ATCC 35218, EC5, EC17, 81617, 68933, 68307), Enterobacter aerogenes (DSMZ 30053, 12676), Enterobacter cloacae (26385, 79232, 93840, 12720, 74892), Klebsiella pneumoniae (25809, 85813, 26385, 13253), Klebsiella oxytoca (26785, 26384, 73739, 26786, 96633), Citrobacter koseri (DSMZ 4595), Citrobacter freundii (80324, 73489), Staphylococcus aureus (ATCC 6538, ATCC 25923, ATCC 29213, 83799, 82913, 73237, 12998), Staphylococcus epidermidis (ATCC 14990, 73711, 35989, 80320, 13000, 77504, 79510), Enterococcus faecalis (ATCC 29212, EF4, 81239, 83776, 27520), Enterococcus faecium (DSMZ 20477), Streptococcus pneumoniae (DSMZ 25500), Streptococcus pyogenes (ATCC 19615, 10388), Proteus mirabilis (26786, ATCC 14153, 27761, 97656, 71913), Proteus vulgaris (DSMZ 13387, 80196), Serratia marcescens (DSMZ 30121), Morganella morganii (DSMZ 6675, 12615), Pseudomonas aeruginosa (26178, 12950, 26535, 68961, 74352), Stenotrophomonas maltophilia (DSMZ 50170, 26394, 26396), Acinetobacter baumannii (DSMZ 30007), Acinetobacter lwoffii (DSMZ 2403, 75496), Acinetobacter radioresistens (DSMZ 6976), Acinetobacter johnsonii (DSMZ 6963), Candida albicans (ATCC 10231, 21179, 27184, 96917, 96635), Candida parapsilosis (4344).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Mikroarray mindestens einen Stamm von mindestens 10 verschiedenen Arten, vorzugsweise mindestens 15 verschiedenen Arten, insbesondere mindestens 20 verschiedenen Arten, von den folgenden Arten: Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Citrobacter koseri, Citrobacter freundii, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Serratia marcescens, Morganella morganii, Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Acinetobacter baumannii, Acinetobacter lwoffii, Acinetobacter radioresistens, Acinetobacter johnsonii, Candida albicans, Candida parapsilosis.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroarrays umfasst immobilisierte Sonden, die multispezifisch sind. Unter "multispezifisch" wird gemäß der vorliegenden Erfindung eine Spezifität bei der Bindung an mehr als eines der gegebenenfalls in einer Blutprobe vorhandenen mikrobiellen Pathogene

NACHGEREICHT

von Blutstrominfektionen verstanden. Das bedeutet, dass eine spezifische Bindung einer einzigen Sonde für die amplifizierten Nukleinsäuren von mehr als einem Pathogen erhalten werden kann. Die Identifizierung einer Nukleinsäure, die spezifisch für mehr als einen Proteus-Typ (z.B. mirabilis oder vulgaris) oder für mehr als einen Acinetobacter-Typ (z.B. baumannii, lwoffii, radioresistens oder johnsonii) ist, wird jedoch erfindungsgemäß nicht als "multispezifisch" betrachtet, nur z.B. eine Sonde, die Serratia marcescens und Citrobacter freundii, Pseudomonas aeruginosa und Stenotrophomonas maltophilia oder Escherichia coli, Proteus mirabilis und Serratia marcescens erkennt (aber gegebenenfalls jedes mit unterschiedlicher Intensität), wird erfindungsgemäß als "multispezifisch" angesehen.

Der erfindungsgemäße Mikroarray umfasst die Sonden vorzugsweise als Spots auf der Oberfläche, wobei vorzugsweise nur eine Sondenart in jedem der Spots anwesend ist. Die erfindungsgemäßen Sonden sind Nukleinsäuremoleküle, insbesondere DNA-Moleküle, die an erfindungsgemäß amplifizierte Nukleinsäuren binden, d.h. spezifisch für mikrobielle Blutstrom-Pathogen-DNA, die für 16S- oder 18S-rRNA codiert. Vorzugsweise bindet die Sonde an den Teil der amplifizierten Nukleinsäure, der sich zwischen den Primersequenzen der Amplifikationsreaktion befindet, wodurch nur der amplifizierte Teil des Amplifikationsprodukts und nicht die Primersequenzen amplifiziert werden. Bei dieser Ausführungsform kann das Risiko des Nachweises von falsch positiven Signalen aufgrund der Primer-Bindung der Sonde ausgeschlossen werden.

Vorzugsweise umfasst der erfindungsgemäße Mikroarray mindestens 10, vorzugsweise mindestens 20, noch bevorzugter mindestens 30, insbesondere mindestens 40, multispezifische immobilisierte Sonden. Gemäß einer speziellen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst der Mikroarray vorzugsweise einen Anteil von mindestens 20 % multispezifische Sonden, vorzugsweise mindestens 40 % multispezifische Sonden, insbesondere mindestens 50 % multispezifische Sonden, der Gesamtanzahl von auf dem Mikroarray immobilisierten Sonden.

Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Mikroarray umfasst mindestens 5, vorzugsweise mindestens 10, noch bevorzugter mindestens 20, noch mehr bevorzugt mindestens 30, insbesondere mindestens 50, Sonden gemäß Seq. ID Nos. 6 bis 80. Vorzugsweise sind die Sonden so ausgewählt, dass sie mindestens 80 %, vorzugsweise

NACHGEREICHT

mindestens 90 %, noch bevorzugter mindestens 95 %, insbesondere mindestens 98%, der mikrobiellen, insbesondere bakteriellen, Pathogene repräsentieren, die mit Sepsis auf dem Mikrochip in Verbindung stehen oder vermeintlich in Verbindung stehen (gemäß anerkannten medizinischen Autoritäten).

Vorzugsweise erfolgt die Korrelierung des Schritts e) unter Verwendung der Informationen über die Bindung von markierten Nukleinsäuren an multispezifische Sonden, die auf der Oberfläche des Mikroarrays immobilisiert sind. Diese Korrelierung kann mittels Computeranalyse erfolgen. Beispielsweise wurde gefunden, dass die Durchführung der Korrelierung des Schritts e) unter Verwendung von vorhergesagten Hybridisierungsmustern mit gewichteten Nichtübereinstimmungen hervorragende Ergebnisse bei der erfindungsgemäßen Untersuchung liefert. Es wurde eine Prototyp-Software entwickelt, die eine statistische Auswertungsroutine liefert und eine korrekte Identifizierung in 100 % der Fälle betreffend die Gattung und in 96 % der Fälle betreffend die Art gestattet. Diese selbstlernende Software (wie im Beispielteil der vorliegenden Erfindung beschrieben) kann in einer vollautomatisierten Analyseplattform implementiert werden, die mit dem Mikroarray zur Pathogenidentifizierung bereitgestellt wird.

Gemäß einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen wie oben definierten Mikroarray. Ein Mikroarray (allgemein auch als Genchip, DNA-Chip oder Biochip bekannt) ist eine Sammlung von mikroskopischen DNA-Spots, die an einer festen Oberfläche wie Glas, Kunststoff oder einem Siliziumchip angebracht sind und einen Array zum Zweck der Expressionsprofilierung bilden, der die Niveaus (Levels) für eine große Anzahl von amplifizierten Nukleinsäuren gleichzeitig überwacht. Mikroarrays können unter Verwendung unterschiedlicher Technologien hergestellt werden, so unter anderem durch Drucken mittels Nadeln mit feinen Spitzen auf Glas-Trägern (Slides), Photolitographie unter Verwendung von vorgefertigten Masken, Photolithographie unter Verwendung von dynamischen Mikrospiegeleinrichtungen, Tintenstrahldrucken oder Elektrochemie auf Mikroelektroden-Arrays. Ein Mikroarray umfasst eine große Anzahl von immobilisierten Oligonukleotidmolekülen, die in hoher Dichte auf dem festen Träger vorgesehen sind. Ein Mikroarray ist ein hochwirksames Werkzeug zum Nachweis von Dutzenden, Hunderten oder sogar Tausenden von verschiedenen Amplifikationsprodukten gemäß der vorliegenden Er-

NACHGEREICHT

findung in einem einzigen Nachweisschritt. Solche Mikroarrays werden oft als Slides oder Platten, insbesondere Mikrotiterplatten, zur Verfügung gestellt. Im Stand der Technik wird ein Mikroarray entweder als miniaturisierte Anordnung von Bindungsstellen (d.h. ein Material, Träger) oder als Träger umfassend miniaturisierte Bindungsstellen (d.h. der Array) definiert. Für die Ausführungsform der vorliegenden Erfindung lassen sich beide Definitionen anwenden. Für die erste dieser Definitionen ist die bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine miniaturisierte Anordnung der Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung in einem Mikroarray. Die Oligonukleotidmoleküle werden vorzugsweise mit Hilfe einer Druckvorrichtung, die eine Immobilisierung in hoher Dichte auf dem festen Träger gewährleistet, auf dem Mikroarray immobilisiert. Dieser Mikroarray ist insbesondere zur Analyse einer großen Anzahl von Proben nützlich. Der erfindungsgemäße Mikroarray ist üblicherweise eine flache Oberfläche mit in regelmäßigen Mustern über diese Oberfläche an bestimmten Stellen immobilisierten Sonden.

Gemäß einer alternativen Ausführungsform schafft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren von mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen in einer Blutprobe, umfassend die folgenden Schritte:

a) Vorsehen einer Blutprobe (die im Verdacht steht, solche mikrobiellen Pathogene zu enthalten),

b) Lysieren der mikrobiellen Pathogene (wenn vorhanden) und Durchführen einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA,

c) Kontaktieren der amplifizierten Nukleinsäuren aus Schritt b) mit einem Mikroarray umfassend immobilisierte Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA auf definierten Bereichen auf der Oberfläche des Mikroarrays,

d) Nachweisen der Bindung von einer oder mehr Art(en) der amplifizierten Nukleinsäuren an eine Sonde durch Nachweisen einer speziell an den Mikroarray gebundenen amplifizierten Nukleinsäure mit Hilfe einer Mikroarray-Einrichtung, die das Bindungsereignis einer amplifizierten Nukleinsäure an eine immobilisierte Sonde nachweist, und

e) Identifizieren eines mikrobiellen Pathogens von Blutstrominfektionen in der Blutprobe durch Korrelieren der nachgewiesenen

NACHGEREICHT

Bindung der amplifizierten Nukleinsäuren mit den definierten Bereichen der immobilisierten Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA. Bei diesem speziellen Alternativverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein Markieren der amplifizierten Nukleinsäuren nicht erforderlich, das Bindungsereignis wird durch ein Hybridisierungssignal an der spezifischen Sonde auf dem Mikroarray detektiert. Diese kann nach herkömmlichen, auf diesem Gebiet zur Verfügung stehenden Methoden auf dem Mikroarray angeordnet werden, so dass jede Sonde oder jeder Sondenspot analysiert werden kann, unabhängig davon, ob ein spezifisches Bindungssignal (Hybridisierungssignal) stattgefunden hat (oder nicht). Bei dieser speziellen Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Mikroarray zusätzliche Mittel oder Einrichtungen zur Detektion eines spezifischen Bindungssignals an eine Sonde oder einen gegebenen Bereich auf der Oberfläche des Mikroarrays. Die Einrichtungen enthalten Schnittstellen zu Computern, die die Bindungsereignisse, z.B. mittels grafischer Darstellungen, sichtbar machen, so dass Bindungsereignisse auf dem Chip (Mikroarray) wirkungsvoll korreliert werden können, um ein vernünftiges analytisches Ergebnis unter Schritt e) gemäß der vorliegenden Erfindung zu liefern.

Gemäß einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Testset umfassend ein Probenhalterungsmittel für eine Blutprobe, einen erfindungsgemäßen Mikroarray und gegebenenfalls Primer zur Durchführung der erfindungsgemäßen Amplifikationsreaktion. Beispielsweise kann das erfindungsgemäße Testset Primer enthalten, die spezifisch für die Amplifikation von mikrobieller DNA sind, welche für 16S- und 18S-rRNA der Pathogene wie in einem der Ansprüche 1, 9 oder 10 definiert codiert.

Gemäß einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Mikroarrays oder eines erfindungsgemäßen Testsets zur Identifizierung von mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen in einer Blutprobe, insbesondere zur Überwachung des Bluts eines Sepsis-Patienten oder eines Sepsis-Risikopatienten.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Figuren und Beispiele weiter veranschaulicht, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt einen phylogenetischen Baum basierend auf der

NACHGEREICHT

16S- und 18S-rRNA-Sequenzanalyse von auf dem neu entwickelten Mikroarray dargestellten Mikroorganismen, berechnet mit dem Nächste-Nachbarn-Verfahren.

Fig. 2 zeigt die Matrix zur Vorhersage des Hybridisierungsverhaltens der designten Mikroarray-Sonden (horizontal aufgetragen). Bereiche von Nichtübereinstimmungen sind farbcodiert. Die ursprüngliche Datei enthielt etwa 19.000 Arten. Fig. 2B zeigt die Legende zu Fig. 2: den Farbschlüssel von gewichteten Nichtübereinstimmungen.

Fig. 3 zeigt die normalisierten Signalstärken sämtlicher Hybridisierungsversuche, gelistet nach Sonde und Art. Die rohen Signalwerte wurden zuerst mittels Quantilnormalisierung normalisiert und dann quer über Spot-Replikate und Hybridisierungsreplikate gemittelt (die echten Werte wurden zur besseren Sichtbarmachung durch 1000 dividiert). Hintergrund-korrigierte Hybridisierungssignale von 5001 - 10000, 10001 - 20000 und >20001 sind in gelb, orange bzw. rot angemerkt. Normalisierte Werte unter 5000 sind nicht farbkoordiniert. Für die Berechnungen wurden absolute Werte ohne Festlegung eines Schwellenwerts verwendet, der zur Anzeige von schwachen Signalen führte, auch wenn die Signale mittels GenePix-Software negativ gekennzeichnet wurden. Die Arten sind entsprechend der phylogenetischen Verwandtschaft von 16S- und 18S-rRNA-Sequenzen gelistet. Die Sonden sind nach ihrer Artenspezifität geordnet. Abkürzungen von Sondennamen sind in Tabelle 3 angeführt.

Fig. 4 zeigt PCR-Produkte von Verdünnungsreihen aus Bakterienzellkulturen, aufgelöst auf einem 1,5%-Agarosegel. Banden können aus einer Anfangszählung von 10^3 Bakterien pro Ansatz nachgewiesen werden.

Fig. 5 zeigt Diagramme des niedrigsten Verdünnungsschritts, in dem ein positives Signal auf dem Mikroarray nachgewiesen werden konnte. Die Verdünnungsreihen wurden aus Einzelkulturen von E. coli (Fig. 5A) bzw. Staphylococcus aureus (Fig. 5B) hergestellt. E. coli zeigte eine viel niedrigere Nachweisgrenze von 10 Bakterien pro Ansatz als Staphylococcus aureus mit 10^3 Bakterien pro Ansatz. Rote, blaue und gelbe Balken stehen für spezifische und nicht spezifische Signale sowie positive Kontrollen (BSrev ist die Hybridisierungskontrolle und pr_FW sowie pr_FW T7 sind PCR-Amplifikationskontrollen). Das markierte Target stammt von dem in Fig. 4 gezeigten PCR-Produkt.

NACHGEREICHT

Fig. 6 zeigt einen Vergleich verschiedener paralleler Pathogen-Identifizierungen. Die Heat-Map wurde nach einem hierarchischen Clustering erstellt. Jede Target-Kombination wurde mit Hybridisierungsergebnissen von Einzelkulturen unter gleichen Versuchsbedingungen verglichen. Die Reihen entsprechen den Sonden und die Spalten den Hybridisierungen. Die Farben entsprechen den Signalwerten. Das heißt Blau steht für einen hohen Signalwert und Rot für keinen Signalwert.

Fig. 7 zeigt die Hybridisierungssignale von E. coli, isoliert aus Vollblut. Trotz des großen Hintergrunds von Human-DNA im Blut wurde keine Interferenz (unspezifische Signale wären in Blau dargestellt) beobachtet. Spezifische Signale sind als rote und positive Kontrollen als gelbe Balken dargestellt.

Fig. 8 zeigt die Isolierung von bakterieller DNA aus Blut, versetzt mit E. coli und Proteus mirabilis, eine multimikrobielle Infektion simulierend. Die Abkürzungen von Sondennamen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die roten, blauen und gelben Balken stehen für spezifische und unspezifische Signale sowie positive Kontrollen.

Fig. 9 zeigt die Auswirkungen der Quantilnormalisierung.

Fig. 10 zeigt die Ergebnisse sämtlicher Hybridisierungsversuche als Heat-Map nach einem hierarchischen Clustering. Die Spalten entsprechen den Sonden, und die Reihen entsprechen den Hybridisierungen. Die Farben entsprechen den Signalwerten. Der Veränderungskoeffizient der verschiedenen Ansätze wurde bereits zusammen mit der Tabelle der normalisierten Signalwerte angegeben. Ein Hybridisierungsergebnis mit E.-coli-Targets wurde aufgrund eines falsch negativen Signals der eco2-Sonde isoliert von den anderen geclustert. Während der Identifizierungsverfahren wurde dies jedoch durch die Rangtransformation und das k-Nächste-Nachbarn-Verfahren vermieden, die immer noch das richtige Ergebnis lieferten. Die die Hybridisierungen anzeigenden Reihen können den folgenden nachgewiesenen Mikroorganismen zugeordnet werden (von oben nach unten): Escherichia coli (35-mal), Citrobacter koseri (8-mal), Candida albicans (8-mal), Candida parapsilosis (4-mal), Candida albicans (2-mal), Escherichia coli (1-mal), Stenotrophomona maltophila (7-mal), Pseudomonas aeruginosa (11-mal), Staphylococcus aureus (20-mal), Staphylococcus epidermis (12-mal), Streptococcus pyogenes (10-mal), Streptococcus pneumoniae (5-mal), Klebsiella oxytoca (10-mal), Enterobacter cloacae

NACHGEREICHT

(11-mal), Klebsiella pneumoniae (4-mal), Enterobacter aerogenes (11-mal), Klebsiella pneumoniae (8-mal), Morganella morganii (6-mal), Citrobacter freundii (9-mal), Serratia marcescens (5-mal), Klebsiella pneumoniae (2-mal), Proteus mirabilis (9-mal), Proteus vulgaris (4-mal), Proteus mirabilis (4-mal), Proteus vulgaris (1-mal), Proteus mirabilis (2-mal), Proteus vulgaris (1-mal), Proteus mirabilis (1-mal), Enterococcus faecalis (12-mal), Enterococcus faecium (3-mal), Acinetobacter lwoffi (3-mal), Acinetobacter johnsonii (3-mal), Acinetobacter lwoffi (1-mal), Acinetobacter baumannii (3-mal), Acinetobacter radioresistens (4-mal), Acinetobacter baumannii (1-mal).

BEISPIELE

Beispiel 1: Proben - Referenzstämme

Alle in dieser Studie getesteten Referenzstämme wurden bei der Amerikanischen Kultur- und Gewebebank (American Type Culture Collection (ATCC) bzw. der "Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur" (DSMZ) bezogen. Neben den Referenzstämmen wurden auch die Sondenspezifität und -sensibilität mit klinischen Isolaten untersucht, die mittels klassischer mikrobiologischer Verfahren identifiziert worden waren. Für eine längere Aufbewahrung wurden sämtliche Bakterienstämme als 50%-Glycerinlösungen bei -80°C gelagert. Für die meisten Versuche wurden Einzelkulturen mit einer bestimmten Anzahl von Bakterien pro ml verwendet, die durch Anzüchten der entsprechenden Mikrobe in Caso-Bouillon über Nacht bei 37°C und schließlich Einstellen der Mikrobenkonzentration pro ml unter Verwendung eines McFarland-Standards # 0,5 erhalten wurden. Die Mikroarray-Untersuchung erfolgte an Escherichia coli (ATCC 35218, EC5, EC17, 81617, 68933, 68307), Enterobacter aerogenes (DSMZ 30053, 12676), Enterobacter cloacae (26385, 79232, 93840, 12720, 74892), Klebsiella pneumoniae (25809, 85813, 26385, 13253), Klebsiella oxytoca (26785, 26384, 73739, 26786, 96633), Citrobacter koseri (DSMZ 4595), Citrobacter freundii (80324, 73489), Staphylococcus aureus (ATCC 6538, ATCC 25923, ATCC 29213, 83799, 82913, 73237, 12998), Staphylococcus epidermidis (ATCC 14990, 73711, 35989, 80320, 13000, 77504, 79510), Enterococcus faecalis (ATCC 29212, EF4, 81239, 83776, 27520), Enterococcus faecium (DSMZ 20477), Streptococcus pneumoniae (DSMZ 25500), Streptococcus pyogenes (ATCC 19615, 10388), Proteus mirabilis (26786, ATCC 14153, 27761, 97656, 71913), Proteus vulgaris (DSMZ 13387, 80196), Serratia marcescens (DSMZ

NACHGEREICHT

30121), Morganella morganii (DSMZ 6675, 12615), Pseudomonas aeruginosa (26178, 12950, 26535, 68961, 74352), Stenotrophomonas maltophilia (DSMZ 50170, 26394, 26396), Acinetobacter baumannii (DSMZ 30007), Acinetobacter lwoffii (DSMZ 2403, 75496), Acinetobacter radioresistens (DSMZ 6976), Acinetobacter johnsonii (DSMZ 6963), Candida albicans (ATCC 10231, 21179, 27184, 96917, 96635), Candida parapsilosis (4344).

Beispiel 2: Oligonukleotidsondendesign

Sondendesign und -analyse erfolgten mit dem ARB-Software-Package (Ludwig et al., 2004). Ausgewählte ribosomale DNA-(rDNA)-Sequenzen von pathogenen Bakterien und Hefen wurden von der GenBank der NCBI Homepage (www.ncbi.nlm.nih.gov) heruntergeladen und auf das ARB-Software-Package geladen, um eine Datenbank mit über 27.000 16S-rDNA-Sequenzen, aber auch über 7.000 18S-rDNA-Sequenzen zu schaffen, um eventuelle Nichtübereinstimmungen mit Eukaryonten-Sequenzen nachzuweisen.

Nach Abgleichen der neuen Sequenzen mit der bereits bestehenden Datenbank wurde ein phylogenetischer Baum unter Verwendung des Nachbar-verknüpfenden Verfahrens berechnet (siehe Fig. 1).

Es wurden Sonden für Arten und ausgewählte Gattungen auf Basis der Ergebnisse der ARB-Software unter Verwendung der Probe-Design-Funktion mit veränderbaren Parametereinstellungen wie Sondenlänge (20 Basen), maximale Nichtgruppentreffer, G+C-Gehalt, Schmelztemperatur und minimale Haarnadelschleifen konstruiert.

Die Sondensequenzen wurden mit der Software "Oligo" auf Duplex- und Haarnadelbildung sowie Schmelztemperatur getestet. Hinsichtlich der Schmelztemperatur wurden anfänglich nicht übereinstimmende Sequenzen durch Deletieren und Hinzufügen von Basen modifiziert.

Die endgültigen Sondensequenzen wurden mit der ARB-Probe-Match-Funktion geprüft. Jede generierte Hybridisierungstabelle mit Sequenzen von Organismen, die mit irgendeiner Einzelsonde übereinstimmten, diente als Eingabe für CalcOligo (www.calcoligo.org), eine Software zur Berechnung von gewichteten Nichtübereinstimmungen. Nichtübereinstimmungen wurden entsprechen experimentell festgelegten Formeln gewichtet (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2).

NACHGEREICHT

Tabelle 1: Gewichte für Nichtübereinstimmungen, bezogen auf ihre Position in der Sequenz. Eine einzige Nichtübereinstimmung an der ersten Position wird mit 0,3 gewichtet, während Nichtübereinstimmungen an zentralen Positionen mit 1,2 am höchsten gewichtet wurden.

5'→3'-Position							
1	2	3	4	N	3	2	1
0,3	0,6	1	1,2	1,2	1,1	0,8	0,3

Tabelle 2: Gewichte von Nichtübereinstimmungen aufgrund des Typs von nicht übereinstimmenden Basen. Eine Nichtübereinstimmung von Adenin auf der Sonde mit Cytosin auf der Zielsequenz wird mit 0,4 gewichtet, während eine Nichtübereinstimmung derselben Sonde mit einem Guanin in der Zielsequenz mit 1,2 gewichtet wird.

Sonde	Target	Sonde	Target	Sonde	Target	Sonde	Target
A	- A 1,0	G	- A 1,0	C	- A 0,7	T	- C 1,0
	- C 0,4		- G 1,0		- C 1,0		- G 1,0
	- G 1,2		- T 1,0		- T 1,0		- T 1,0

Einzelne Nichtübereinstimmungen jeder Sonde wurden addiert, um einen gewichteten Gesamtwert für jede Art zu ergeben. Die Werte wurden zur Erstellung einer Hybridisierungsmatrix gereiht, der Reihe nach in einem Spread-Sheet tabellarisiert (siehe Fig. 2 für die Endergebnisse dieser Hybridisierungsmatrix).

Aufgrund der klinischen Relevanz von Candida sp. wurden sie auch zur Detektion in Betracht gezogen, ausgenommen mit ihrer 18S-rRNA-Sequenz. Der Baum (siehe Fig. 1) zeigt weiters eine klare Differenzierung von Gram-positiven Cocci sp. und gram-negativen Bakterien. Mitglieder der Familie der Enterobacteriaceae bilden eine isolierte Gruppe an der Spitze des Baums, was auf eine geringe Verwandtschaft mit den anderen Arten und starke interne Sequenzähnlichkeiten hinweist. Innerhalb dieser Gruppe sind die einzelnen Arten eng miteinander verwandt, weshalb eine entsprechende Identifizierung von zu dieser Gruppe gehörenden Bakterien relativ schwierig wird.

NACHGEREICHT

Sondensequenzen

Es wurden Sonden für ausgewählte Arten basierend auf mehreren individuellen Sequenzen, ausgewählt aus der ARB-Datenbank, konstruiert. Alles in Allem wurden unter Verwendung des ARB-Software-Package 96 verschiedene DNA-Sonden designt. Weitere Sonden wurden von der probeBase-Website (www.microbial-ecology.net/probebase/) (Loy A. et al., 2003) heruntergeladen. Sämtliche in dieser Studie verwendeten rDNA-Sonden sind in Tabelle 3 angeführt.

Tabelle 3: Liste von in dieser Studie verwendeten Sonden einschließlich ihrer Nukleotidsequenzen und einiger Merkmale. Abkürzungen: Ab: *Acinetobacter*, Cb: *Citrobacter*, Eb: *Enterobacter*, Ec: *Enterococcus*, E: *Escherichia*, K: *Klebsiella*, M: *Morganella*, P: *Proteus*, Pm: *Pseudomonas*, Sr: *Serratia*, Sm: *Stenotrophomonas*, Str: *Streptococcus*, Sta: *Staphylococcus*, C: *Candida*

Spezifität	***Name***	***E. coli Pos.***	***Sequenz[5'-3']***	***Länge (Basen)***	***T (°C)***	***GC-Gehalt %***	***SEQ ID No.***
Ab. baumannii	aba1	64	CAAGCTACCTTCCCCCGCT	19	60,3	63	6
	aba2	453	GTAACGTCCACTATCTCTA-GGTATTAACTAAAGTAG	36	59,1	36	7
	aba4	1132	GCAGTATCCT-TAAAGTTCCCATCCGAAAT	29	60,8	41	8
Ab. johnsonii	ajo2	620	TCCCAGTATCGAAT-GCAATTCCTAAGTT	28	60,1	39	9
	ajo3	979	GAAAGTTCTTACTATGT-CAAGACCAGGTAAG	31	58,8	39	10
	ajo4	1114	CTTAACCCGCTG-GCAAATAAGGAAAA	26	60	42	11
Ab. lwoffii	alw1	133	GAGATGT-TGTCCCCCACTAATAGGC	25	60,4	52	12
	alw2	577	TGACTTAATTGGC-CACCTACGCG	23	61	52	13
	alw3	637	CCCATACTCTAGCCAAC-CAGTATCG	25	59,9	52	14
Ab. radioresistens	ara1	78	CGCT-GAATCCAGTAGCAAGCTAC	23	59,1	52	15
	ara2	450	GTCCACTATCCTAAAGTAT-TAATCTAGGTAGCCT	34	60,3	38	16

NACHGEREICHT

Spezifität	Name	E. coli Pos.	Sequenz[5'-3']	Länge (Basen)	T (°C)	GC-Gehalt %	SEQ ID No.
	ara3	1115	CCGAAGTGCTG-GCAAATAAGGAAA	24	59,8	46	17
Cb. freundii	cif1	62	GCTCCTCTGCTACCGTTCG	19	58,2	63	18
	cif2	442	CCACAACGCCTTCCTCCTCG	20	61,1	65	19
	cif3	472	TCTGCGAGTAACGT-CAATCGCTG	23	60,7	52	20
Cb. koseri	cik1	469	CGGGTAACGTCAATTGCT-GTGG	22	59,9	55	21
	cik2	639	CGAGACTCAAGCCTGC-CAGTAT	22	60	55	22
Eb. cloacae	ecl4	471	GCGGGTAACGTCAATTGCT-GC	21	60,6	57	23
	ecl6	643	CTACAAGACTCCAGCCT-GCCA	21	60	57	24
	ecl7	652	TACCCCCCTC-TACAAGACTCCA	22	60	55	25
Eb. aerogenes	ena2	444	GGTTATTAACCT-TAACGCCTTCCTCCT	27	60,2	44	26
	ena3	453	CAATCGCCAAGGTTAT-TAACCTTAACGC	28	60,4	43	27
	ena4	473	TCTGCGAGTAACGT-CAATCGCC	22	60,8	55	28
K. pneumoniae	kpn1	61	GCTCTCTGTGCTACCGCTCG	20	60,7	65	29
	kpn2	203	GCATGAGGCCCGAAGGTC	18	58,9	67	30
K. oxytoca	klo1	81	TCGTCACCCGAGAGCAAGC	19	60,5	63	31
	klo2	633	CCAGCCTGC-CAGTTTCGAATG	21	60	57	32
E. coli	eco2	448	GTAACGTCAATGAGCAAAG-GTAT-TAACTTTACTCCCTTCC	40	61,9	40	33
	eco3	994	CCGAAGGCACATTCT-CATCTCTGAAAACTTCCGT-GGATG	39	65,6	49	34
M. morganii	mom2	121	GCCATCAGGCAG-ATCCCCATAC	22	60,9	59	35

NACHGEREICHT

Spezifität	Name	E. coli Pos.	Sequenz[5'-3']	Länge (Basen)	T (°C)	GC-Gehalt %	SEQ ID No.
	mom3	440	CTTGACACCTTCCTCCCGACT	21	59,7	57	36
	mom4	581	CATCTGACTCAATCAACCGCCTG	23	59,4	52	37
P. mirabilis	pmi3	247	GTCAGCCTTTACCCCACCTACTAG	24	59,8	54	38
	pmi4	444	GGGTATTAACCTTATCACCTTCCTCCC	27	60	48	39
	pmi5	625	CCAACCAGTTTCAGATGCAATTCCC	25	60,4	48	40
	pmi6	820	GTTCAAGACCACAACCTCTAAATCGAC	27	59,3	44	41
P. vulgaris	pvu2	179	CTGCTTTGGTCCGTAGACGTCA	22	60,3	55	42
	pvu4	1010	TTCCCGAAGGCACTCCTCTATCTCTA	26	61,9	50	43
Pm. aerogenes	psa4	585	GATTTCACATCCAACTTGCTGAACCA	26	59,9	42	44
	psa5	1136	TCTCCTTAGAGTGCCCACCCG	21	61,7	62	45
	psa6	1245	CGTGGTAACCGTCCCCCTTG	20	61	65	46
Sr. marcescens	sem1	62	CTCCCCTGTGCTACCGCTC	19	60,4	68	47
	sem2	439	CACCACCTTCCTCCTCGCTG	20	60,7	65	48
	sem3	460	GAGTAACGTCAATTGATGAGCGTATTAAGC	30	59,8	40	49
Sm. maltophilia	sma1	713	AGCTGCCTTCGCCATGGATGTTC	23	63,7	57	50
	sma3	1265	TGGGATTGGCTTACCGTCGC	20	61	60	51
Str. pneumoniae	spn1	56	CTCCTCCTTCAGCGTTCTACTTGC	24	60,7	54	52
	spn3	201	GGTCCATCTGGTAGTGATGCAAGTG	25	60,9	52	53
	spn5	634	TCTTGCACTCAAGTTAAACAGTTTCCAAAG	30	60,1	37	54
Str. pyogenes	spy1	175	ATTACTAACATGCGTTAGTCTCTCTTATGCG	31	60,2	39	55

NACHGEREICHT

Spezifität	Name	E. coli Pos.	Sequenz[5'-3']	Länge (Basen)	T (°C)	GC-Gehalt %	SEQ ID No.
	spy2	471	CTGGTTAGTTACCGTCACT-TGGTGG	25	60,8	52	56
	spy3	623	TTCTCCAGTTTCCAAAGCGT ACATTG	26	59,6	42	57
Ec. faecium	efa1	67	CAAGCTCCGGTG-GAAAAAGAAGC	23	60,3	52	58
	efa2	208	CATCCATCAGCGACACCCGA	20	60,4	60	59
	efa3	1240	ACTTCGCAACTCGT-TGTACTTCCC	24	60,8	50	60
	efa42	446	CCGTCAAGGGATGAACAGT-TACTCTCATCCTTGTTCTTC	39	66,8	46	61
	efa43	1242	ATTAGCT-TAGCCTCGCGACTTCGCAAC TCGTTGTACTTC	39	69,3	49	62
	efa51	65	CTCCGGTG-GAAAAAGAAGCGT	21	59	52	63
	efa52	82	CTCCCGGTGGAGCAAG	16	57	52	64
Staphylo coccus	sta1	995	CTCTATCTCTAGAGCGGT-CAAAGGAT	26	59	46	65
	sta2	1137	CAGTCAACCTAGAGTGC-CCAACT	23	60	52	66
	sta3	1237	AGCTGCCCTTTGTAT-TGTCCATT	23	59	44	67
	sta4	1264	ATGGGATTTGCAT-GACCTCGCG	22	62	55	68
Sta. aureus	sar1	186	CCGTCTTTCACTTTTGAAC-CATGC	24	59	46	69
	sar2	230	AGCTAATGCAGCGCGGATC	19	59	58	70
	sar3	447	TGCACAGTTACTTACA-CATATGTTCTT	27	57	33	71
Sta, epidermidis	sep1	1005	AAGGGGAAAACTCTATCTC-TAGAGGG	26	59	46	72
	sep2	983	GGGTCAGAGGATGT-CAAGATTTGG	24	59	50	73
	sep3	993	ATCTCTAGAGGGGTCAGAG-GATGT	24	60	50	74
Ec. faecalis	efc1	84	CCACTCCTCTTTCCAAT-TGAGTGCA	24	61	50	75

NACHGEREICHT

Spezifität	Name	E. coli Pos.	Sequenz[5'-3']	Länge (Basen)	T (°C)	GC-Gehalt %	SEQ ID No.
	efc2	176	GCCATGCGGCATAAACTGT-TATGC	24	61	50	76
	efc3	193	CCCGAAAGCGCCTTTCACTC TT	22	62	55	77
	efc4	452	GGACGTTCAGT-TACTAACGTCCTTG	25	59	48	78
C. albi-cans	cal1	-	CCAGCGAGTATAAGCCTTG-GCC	22	61,2	59	79
C. para-psilosis	cpa1	-	TAGCCTTTTTGGCGAAC-CAGG	21	60,6	52	80

Beispiel 3: Mikroarray-Herstellung

Oligonukleotidsonden wurden bei VBC Genomics (Österreich) bezogen. Am 5'-Ende jedes Oligos wurden fünf Thyminreste als Spacer-Moleküle angefügt. Zur Gewährleistung der kovalenten Bindung an die reaktive Aldehydgruppe auf der Oberfläche des Mikroarrays (CSS-100 Silylated Slides, Cel Associates, USA) wurden die Sonden 5'-aminomodifiziert. Die Sonden wurden mit einem Kontakt-Arrayer (Omnigrid, GeneMachines) in unterschiedlichen Konzentrationen (50 µM, 20 µM und 10 µM in 3 x SSC und 1,5 M Betainmonohydrat) auf die silylierten Glas-Slides gedruckt, während die Luftfeuchtigkeit zwischen 55 und 60% eingestellt war.

Pro Mikroarray wurden sechs Replikate von jeder Probe gedruckt. Das Spotten erfolgte mittels SMP-3-Nadeln (TeleChem, USA), die eine Spotgröße von 100 µm Durchmesser lieferten.

Beispiel 4: Target-Präparation

DNA-Isolierung

Durch steriles Abnehmen in ein 10-ml-K3E-Röhrchen (BD Vacutainer Systems, UK) wurden Blutproben genommen. Das Blut wurde mit Bakterien versetzt, wobei die entsprechende Dichte unter Verwendung eines McFarland-Standards # 0,5 eingestellt wurde und eine Übertragung des korrekten Volumens bzw. der korrekten Verdünnung in 10 ml Vollblut erfolgte. Zur Trennung von Leukozyten wurde ein Filtrationsschritt durchgeführt. Die Bakterien gelangten durch das Filter. Wurde keine Filtration vorgenommen, wurde alternativ das folgende Percoll-Verfahren angewendet. Für die vorbereitende Blutzelllyse wurden 3 ml Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA), pH 8, zugegeben, gemischt und 10 min lang mit 10000 g

NACHGEREICHT

zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, um ein kleines Pellet zu erhalten, das in physiologischer NaCl resuspendiert und vorsichtig auf eine Percoll-Lösung (Amersham Biosciences) aufgebracht wurde. Die physikalische Dichte von Percoll wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers auf 1,05 g/cm^3 eingestellt. Die Dichtezentrifugation erfolgte 20 min lang mit 1500 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zur Entfernung von restlichem Percoll mit physiologischer NaCl gespült. Das verbleibende Pellet wurde in 50 µl destilliertem Wasser resuspendiert, und die Zelllyse erfolgte durch Erhitzen der Suspension auf 95°C 15 min lang. Die DNA-Suspension wurde durch 10 min langes Zentrifugieren mit 10000 g und Übertragen des Überstands in ein neues Röhrchen erhalten.

DNA-Amplifikation

Das 16S-rRNA-Gen wurde unter Verwendung des Forward-Primers 27 T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGAGAGTTTGATCMTGGCTCAG; SEQ ID No. 1) und des Reverse-Primers 1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT; SEQ ID No. 2) (VBC Genomics, Österreich) (0.3 nM in PCR-Mischung) (Gutenberger et al., 1991) PCR-amplifiziert. Die Forward-Primer enthielten die T7-Promotorstelle (5'-TAATACGACTCACTATAG-3'; SEQ ID No. 3) an ihrem 5'-Ende, was eine T7-RNA-Polymerase-vermittelte in-vitro-Transkription unter Verwendung der PCR-Produkte als Templates für einen direkten Vergleich verschiedener Markierverfahren möglich machte (Bodrossy et al., 2003). Candida-Arten wurden durch vorherige Amplifikation des 18S-rRNA-Gens mit den Primern CanFW (5'- TCCGCAGGTTCACCTAC; SEQ ID No. 4) und Can-Rev (5'- CAAGTCTGGTGC CAGCA; SEQ ID No. 5) (White et al., 1990) identifiziert.

Bakterien in 10 ml Vollblut dienten als Target-Szenario für die Optimierung der Generierung von 16S-rRNA-Amplikons in voller Länge. Die PCR-Leistung wurde mit bakterieller DNA, isoliert aus 1 ml Blut, durch Variieren der Konzentrationen verschiedener Bestandteile und Zugabe von PCR-Enhancern optimiert. Die optimalen Bedingungen für eine 25-µl-PCR-Reaktionsmischung waren: 3 U Taq DNA-Polymerase (Invitrogen, California), 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 2 mM $MgCl_2$; 10% Glycerin und 0,5% Betain.

Das PCR-Cycling umfasste einen anfänglichen Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 30 s, 55°C für 1 min und 72°C für 1 min. Die Temperaturzyklen wurden für 10 min bei 72°C beendet, um Teilamplikons fertig zu

NACHGEREICHT

stellen, worauf die Aufbewahrung bis zur Verwendung bei 4°C erfolgte.

Die erfolgreiche Amplifikation wurde durch Auflösung der PCR-Produkte auf 1,5%-Agarosegel (SeaKem, Biozym) mit Ethidiumbromid in TBE-Puffer (0,1 M Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA) (Invitrogen, UK) bestätigt.

Die Amplifikationsprodukte wurden entweder direkt oder in einer Primerverlängerungs-PCR markiert.

Für Direktmarkierverfahren wurden entweder 6 nmol Cy5-dCTP (Amersham Biosciences, UK) oder 0,3 nM Cy3 5'-markierte Primer pro Reaktionsmischung verwendet.

Markieren

Verschiedene Markierstrategien wie Primerverlängerung, in-vitro-Transkription, Biotin-Streptavidin-Markieren, isothermisches Markieren auf Klenow-Fragment-Basis oder direktes PCR-Markieren unter Verwendung des am 5'-Ende markierten Primers wurden optimiert und verglichen. Gute Ergebnisse konnten auch ohne Reinigung der PCR-Produkte erzielt werden. Das Primerverlängerungsverfahren zeigte eine gute Sensitivität und Spezifität und wurde daher als Standardverfahren verwendet. 6 µl PCR-Produkt wurden zum Markieren in der Primerverlängerungsreaktionsmischung verwendet, die 0,9 mM Forward-Primer 27, 1,5 E Vent (exo) Polymerase (New England Biolabs, UK), 3 mM $MgSO_4$ und 50 µM of dATP, dGTP, dTTP, dCTP und 25 µM Cy5-dCTP enthielt. Die Reaktionsmischung wurde 25x bei 95°C, 60°C und 72°C jeweils 20 s zyklisiert, gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt bei 72°C für 5 min. Vor den Temperaturzyklen wurde 3 min lang bei 95°C inkubiert.

Beispiel 5: Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurden die Mikroarray-Slides mit Blockierpuffer (Cyanoborhydridpuffer: 20 mM $Na_2H\ PO_4$, 10 mM NaH_2PO_4, 200 mM NaCl, 50 mM $NaBH_3CN$) 30 min lang bei Raumtemperatur vorbehandelt, um reaktive Gruppen auf der Slide-Oberfläche zu inaktivieren.

Die Hybridisierungsmischung wurde auf eine Endkonzentration von 4x SSC, 0,1 % SDS in 24 µl amplifizierter und markierter DNA-Reaktionsmischung eingestellt. Ein Gesamtvolumen von 22 µl wurde auf ein Deckglas (22 x 22 mm) übertragen und auf die Mikroarray-Oberfläche appliziert. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C in einer mit Dampf gesättigten Kammer während 1 Stunde. Die Slides wurden in 2x SSC und 0,1 % SDS 5 min lang und anschließend mit

NACHGEREICHT

0,2 x SSC 2 min lang und 0,1x SSC 1 min lang gewaschen. Die Slides wurden durch Zentrifugieren mit 900 g 2 min lang getrocknet.

Beispiel 6: Signaldetektion und Datenanalyse

Die Slides wurden mit einer Auflösung von 10 µm mit einem Axon Genepix 4000A Mikroarray-Scanner (Axon, USA) bei gleicher Laserleistung und gleichem Sensitivitätsniveau des Photomultiplizierers (650 pmt) für jedes Slide gescannt. Daher sind die für unabhängige Versuche präsentierten absoluten und relativen Signalstärken direkt vergleichbar. Die erhaltenen Bilder wurden unter Verwendung der Genepix-Software analysiert, und die resultierenden gpr-Dateien wurden für eine weitere Analyse verwendet.

Statistische Auswertung

Die Datenanalyse erfolgte in R (www.r-project.org) unter Verwendung von Limma-, Affy-, Stats- und Class-Packages. Die Datensets bestanden aus 241 Hybridisierungen, die an drei verschiedenen Layouts des Mikroarrays zur Pathogen-Identifizierung durchgeführt wurden. Die verschiedenen Layouts teilen sich 76 Sonden; diese wurden bei der Analyse verwendet. Alle anderen Sonden wurden nicht berücksichtigt. Jedes Pathogen wird von 2 bis 5 verschiedenen Sonden mit verschiedenen Sequenzen repräsentiert. Zur Erhöhung der Robustheit wurden die Sonden sechs Mal auf den Array gespottet.

Jede Hybridisierung wurde von einer gpr-Datei dargestellt, die alle kollektiv als RGList-Objekte in R. aufbewahrt wurden. Die Signale wurden unter Verwendung der Quantilnormalisierung aus dem Affy-Package normalisiert. Zentralwerte der sechs Spot-Replikate wurden für das überwachte k-Nächste-Nachbarn-Klassifikationsverfahren (k = 1) verwendet. Der Klassifizierer wurde in einem Leave-One-Out-Kreuzvalidierungsansatz validiert. (Das kNN erfolgte gemäß Ripley (1996) "Pattern Recognition and Neural Networks", Cambridge and Venables et al. (2002), "Modern Applied Statistic with S.", 4th Ed., Springer; die Quantilnormalisierung erfolgte nach Bolstad et al., Bioinformatics 19(2) (2003), 185-193.)

Normalisierung

Die Normalisierung ist ein wichtiger Aspekt bei allen Mikroarray-Versuchen. Üblicherweise erfordert sie eine Gruppe von Sonden, von denen erwartet wird, dass sie ein konstantes Signal über alle Hybridisierungen liefern. Bei der vorliegenden Versuchsreihe war dies nicht möglich. Daher wurde ein Quantilnormalisierungs-

NACHGEREICHT

ansatz basierend auf der Annahme gewählt, dass jeder Array eine Anzahl von Sonden haben sollte, die ein positives Signal liefern (entsprechend dem in der Probe enthaltenen Pathogen), und der Rest der Sonden ein schwaches (oder kein) Signal. Dieser Algorithmus ist ein Zwischen-Array-Normalisierungsansatz, bei dem das höchste Signal jedes Arrays mit dem Durchschnitt der Spitzensignale über alle Arrays und dann das zweithöchste Signal mit dem Durchschnitt aller zweithöchsten Signale usw. ersetzt werden. In den Dichte-Diagrammen ist dies durch eine Verschiebung jedes Dichte-Diagramms zwecks Übereinstimmung der Durchschnittsdichte über alle Arrays veranschaulicht.

Beispiel 7: In-silico-Hybridisierungsmatrix

Mit der Probe-Match-Funktion im ARB-Software-Package und der CalcOligo-Software wurde eine Hybridisierungsmatrix erzeugt. Das modellierte Hybridisierungsverhalten jeder Sonde (Fig. 2) stimmte gut mit den echten Versuchsdaten überein.

Aufgrund der stark konservierten 16S-rRNA-Sequenzen jedes Mitglieds, die zu einer starken Clusterbildung in der vorhergesagten Hybridisierungsmatrix führten, war eine Kreuzhybridisierung innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae zu erwarten. Sonden für andere Arten sollten zu spezifischen Signalen führen. Insbesondere von Gram-positiven Arten wurde erwartet, dass sie artspezifische Signale liefern. Im Gegensatz dazu zeigten Gram-negative Bakterien innerhalb der Citrobacter-, Enterobacter-, Klebsiella-Gruppe weniger spezifische Hybridisierungen.

Schließlich konnten jedoch auch diese individuellen Arten durch spezifische Signalmuster, die von multiplen Sonden stammten, identifiziert werden. Alle anderen Gram-negativen Bakterien konnten hinsichtlich der Art eindeutig differenziert werden. 18S-rRNA-Sonden von Candida sp. zeigten keine unspezifischen Signale bei Bakterienarten und lieferten eine gute Unterscheidbarkeit zwischen den Arten. Die vorhergesagten Hybridisierungswerte konnten durch die experimentellen Daten bestätigt werden.

Beispiel 8: Spezifität

Die normalisierten Signalwerte von 241 Hybridisierungsversuchen sind in Fig. 3 zusammengefasst. Die beobachteten Hybridisierungswerte zeigten einen niedrigen Variationskoeffizienten (VK) bei den sechs Replikat-Spots und zwischen den verschiedenen Assays. Der VK aller spezifischen Signale lag in einem Bereich von 2,4 % bis 64,1 % bei 80 % der Sonden. Die Versuchsergebnisse

NACHGEREICHT

korrelierten gut mit dem vorhergesagten Hybridisierungsverhalten aus der ARB- und CalcOligo-Software (ein Vergleich mit Fig. 2 zeigt ähnliche Hybridisierungsintensitäten). Wie von der CalcOligo-Analyse erwartet, fand eine Kreuzhybridisierung einzelner Sonden innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae, insbesondere in der Gruppe Klebsiella-Enterobacter-Citrobacter statt. Es konnten jedoch jeder Art spezifische Signalmuster zugeordnet werden, was die Identifizierung von Kulturen hinsichtlich der Art ermöglichte.

Beispiel 9: Sensitivität

Grenzen für den Nachweis von Bakterien (LOD) wurden mit versetzten Blutproben und Einzelkulturen unter Verwendung von Verdünnungsreihen von 10^8 bis 10^0 Bakterien pro ml von ausgewählten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienarten festgelegt. Die Nachweisgrenze bei Einzelkulturen war niedriger als bei versetztem Blut aufgrund der PCR-Interferenz von Blutbestandteilen. Es zeigte sich, dass mit Einzelkulturen durchgeführte PCRs DNA bis zu 103 Zellen pro Ansatz amplifizierten, was zu einer deutlich sichtbaren Bande auf 1,5%-Agarosegel führte (siehe Fig. 4).

Die Identifizierung auf Basis von Mikroarrays war 100 Mal sensitiver als die nachgewiesene Agarosegel-Auswertung. Spezifische und reproduzierbare Signale bis zu 10 Bakterien pro Ansatz konnten für E. coli erzielt werden. Eine Analyse von Staphylococcus-Kulturen zeigte die höchste Nachweisgrenze innerhalb der Gruppe von Gram-positiven Bakterien, wobei etwa 10^3 Zellen pro Ansatz notwendig waren, um Signale auf dem Mikroarray zu sehen (siehe Fig. 5). Dieser Unterschied in der Sensitivität kann weniger effizienten Zelllysen aufgrund der Anwesenheit einer persistenten Zellwand oder der Anwesenheit von hitzestabiler DNAse im Staphylococcus-Proteom zugeschrieben werden (Heininger et al., 2004). Die beabsichtigte Verwendung des Werkzeugs setzt jedoch ein rasches und zuverlässiges Verfahren voraus, das nach einem Kompromiss zwischen Zeit, Anwendbarkeit und Sensitivität ruft. Die Übernahme des Protokolls für verschiedene Zelllyse-Schritte oder eine zusätzliche enzymatische Behandlung kann die Nachweisgrenze weiter verbessern.

Beispiel 10: Paralleldetektion von Pathogenen

Die Dichte von Bakteriensuspensionen wurde eingestellt wie in Beispiel 4 beschrieben, und gleiche Mengen wurden für Einzelarten- und Doppelartenversuche verwendet. Die Hybridisierungs-

NACHGEREICHT

ergebnisse von Kombinationen verschiedener Stämme wurden mit jenen von Einzelstämmen verglichen. Es zeigte sich, dass die Signalstärken bei derselben Bakterienbelastung ähnlich sind, egal ob es sich dabei um eine Einzelart oder eine Artenkombination handelt. Die multiplen Mikrobenansätze lieferten ein Signalmuster, das die zusammengesetzten Signale von Einzelarthybridisierungen zeigte (Fig. 6). Aufgrund dieser Resultate ist eine klare Differenzierung von Arten bei einer multiplen Mikrobeninfektion möglich. Einige Versuche wurden auf Basis von versetztem Blut durchgeführt und dabei bestätigten sich die Ergebnisse von Einzelkulturen (Fig. 8).

Beispiel 11: Hybridisierung von Blutprobenisolaten

Die PCR- und Markierprotokolle wurden mit bakterieller DNA, isoliert aus Blutproben, zur Reduktion der Interferenz von Blutbestandteilen optimiert. Durch die Zugabe von Glycerin und Betain wurde die nicht spezifische Amplifikation während der PCR und der Markierschritte trotz großer Mengen von restlicher Human-DNA verringert. Dadurch wurde auch die Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt deutlich erhöht, was wie bei kultivierten Mikroben zu gleichen Spezifitäten führte. Es wurde keine durch Human-DNA ausgelöste Kreuzhybridisierung beobachtet (Fig. 7). Ähnliche Resultate wurden durch den Nachweis von Kombinationen von Einzelmikroben beobachtet, die multiple Mikrobeninfektionen simulierten, wie bereits oben beschrieben. Die erhaltenen Signalmuster waren sowohl für die zugesetzten Stämme als auch für jene aus Einzelarten-Mikroarray-Hybridisierungen spezifisch (Fig. 8).

Die Sensitivität des Verfahrens wurde durch Vorsehen einer zehnschrittigen Verdünnungsreihe in 10 ml versetztem Blut ermittelt. Es wurde gefunden, dass die Nachweisgrenze bei nur 10 Bakterien pro ml Vollblut lag. Wie mit Einzelkulturen beobachtet, ist die Sensitivität von Gram-positiven Bakterien jedoch viel höher, z.B. 10^5 pro ml Blut bei Staphylococcus aureus.

Beispiel 12: Candida

Vier spezifische auf das 18S-rRNA-Gen abzielende Candida-sp.-Sonden wurden in die auf dem Mikroarray vorhandenen Mikrobensonden einbezogen. Fig. 3 zeigt bereits geringe Kreuzhybridisierungen mit bakteriellen Zielsequenzen, was auf eine sehr hohe Spezifität von Candida-Sonden hindeutet. Unspezifische Signalantworten von Candida-albicans-Targets wurden von Acinetobacter-lwoffi-Sonden erhalten. C. parapsilosis zeigte eine schwache Hy-

NACHGEREICHT

bridisierung mit der spn3-Sonde, die spezifisch für Streptococcus pneumoniae ist. Für Bakterien optimierte Protokolle wurden auch für Candida sp. mit ähnlichen Ansprechpegeln angewendet. Zur Optimierung der PCR für die zwei Primerpaare musste die Konzentration des 16S-rRNA-Primers gegenüber dem 18S-rRNA-Primer verdreifacht werden.

Beispiel 13: Klassifizierung

Fig. 9 zeigt deutlich die Hybridisierungs- und Sondencluster. Auch wenn jede Sonde zur Bindung an ein spezifisches Pathogen ausgelegt war, zeigt die Wärmekarte, dass manche Sonden für eine Art sehr spezifisch sind, während andere Signale für einen weiteren Bereich von verschiedenen Organismen liefern und einige wenige Sonden überhaupt kein spezifisches Signal zeigen. Ein klassischer Ansatz wäre die Evaluierung jeder Sondengruppe quer über alle Hybridisierungen und die Festlegung einer Signalschwelle, z.B. durch ROC-Analyse (Bilban et al., 2002), zur Unterscheidung von positiven und negativen Signalen. Da manche Sonden eine Kreuzhybridisierung zwischen Arten oder auch Gattungen zeigen, würde dies jedoch nicht nur zu Problemen mit der Spezifität führen, sondern würde das auch einen Verlust von in den Kreuzhybridisierungsmustern enthaltenen Informationen bedeuten. Ein Maschinenlernansatz wurde zur Klassifizierung eines Hybridisierungsmusters durch Ähnlichkeit zu Hybridisierungen mit bekannten Organismen verwendet. Das k-Nächste-Nachbarn-Verfahren (k = 1) wurde in einem Leave-One-Out-Kreuzvalidierungsansatz verwendet und validiert. Bei den Gattungen wurden alle 241 Hybridisierungen korrekt geschichtet und bei den Arten 96,7 %.

Schlussbemerkungen

Der zur Identifizierung von durch Blut übertragenen Pathogenen präsentierte Mikroarray ist das erste molekulardiagnostische Werkzeug, das in der Lage ist, einen weiten Bereich von klinisch relevanten Bakterien und Hefen direkt aus Blut in einem angemessenen Zeitraum zu identifizieren.

Die Kombination aus PCR-Amplifikation und Mikroarray-Hybridisierung stellt ein wirksames Werkzeug zur Identifizierung von Pathogenen dar. Sie übertrifft übliche Technologien an Geschwindigkeit, arbeitet dabei aber mit äußerst hoher Spezifität. Zuvor wurde über eine Analyse von 16S-rRNA-Genen berichtet, mit der eine robustere, besser reproduzierbare und genauere Untersuchung als mit phenotypischen Verfahren möglich wurde (Clarridge, 2004).

NACHGEREICHT

Das ARB-Software-Package analysierte über 27.000 Sequenzen, um das Hybridisierungsverhalten ausgewählter Arten zu berechnen. Vorhergesagte und experimentell ermittelte Werte entsprachen einander. 23S-rRNA-Gene wurden parallel mit 16S-rRNA-Targetsonden getestet. Das 16S-rRNA-Gen wurde aufgrund der größeren Sequenz-Datenbank gegenüber dem 23S-rRNA-Gen bevorzugt.

Die Sensitivität wurde durch die Einführung eines DNA-Amplifikationsschritts vor dem Markieren erhöht. Die Wahl der Amplifikations- und Markierstrategien wirkte sich erheblich auf die Sensitivität aus, während sie bei der Spezifität nur geringe Änderungen bewirkte. Die Hybridisierung an einen Mikroarray führt zu einer etwa 100 Mal höheren Sensitivität als die direkte Detektion amplifizierter Targets.

Klinische Standard-Identifizierungsverfahren erfordern 2 Tage, und bis zu 5 Tage für schwierig zu kultivierende Mikroorganismen. Systeme auf Mikroarray-Basis ermöglichen eine rasche und genaue Identifizierung von Mikroorganismen. Das vorliegende Protokoll wurde innerhalb von 6 Stunden von der Blutabnahme bis zur Präsentation der Ergebnisse durch Analyse-Software durchgeführt. Aktuelle PCR-Cyclingzeiten von etwa 2,5 Stunden ließen sich mit kapillaren oder miniaturisierten PCR-Geräten, die eine vollständige PCR innerhalb weniger als 20 min gestatten, signifikant reduzieren.

Auf DNA basierende Verfahren ermöglichen den Nachweis von statischen oder auch toten Zellen vor dem Genomabbau z.B. im Fall der Verabreichung von Antibiotika, wenn kein weiteres Kulturwachstum zu beobachten ist (Heininger et al., 1999).

Bei Anwendung eines überwachten k-Nächste-Nachbarn-Klassifikationsverfahrens (k = 1) wurden sämtliche untersuchten Bakterien und Hefen hinsichtlich der Gattung und 96 % hinsichtlich der Art korrekt identifiziert. Eine starke 16S-rDNA-Sequenz-Ähnlichkeit verursachte eine falsche Klassifikation bei Proteus mirabilis und vulgaris sowie Acinetobacter radioresistens und baumanii.

Die meisten veröffentlichten Verfahren konnten bisher nur die Zugehörigkeit zur Familie der Enterobacteriaceae oder zu anderen Gram-positiven Gattungen wie Staphylococcus und Streptococcus erkennen. Darüber hinaus wurde bisher noch keine Methode zur gleichzeitigen Identifizierung von Bakterien und Hefen veröffentlicht (Shang et al., 2005; Jordan et al., 2005; Kempf et al., 2000; Jansen et al., 2000; Jordan und Durso, 2005).

NACHGEREICHT

7 % aller Blutstrom-Infektionen sind polymikrobiell (Henry et al., 1983). Signalmuster von multiplen Mikroorganismen konnten von Einzelmikrobensignalen ausgehend interpretiert werden. Die Signalstärken waren gleich wie jene von Einzelinfektionen. Das Sondenpanel war spezifisch für alle willkürlich ausgewählten dualen Bakterienkombinationen. Negative Kontrollen von unversetztem Blut lieferten negative PCR-Amplifikations- und Hybridisierungsergebnisse. Das bestätigt die Abwesenheit von pleomorphen Bakterien oder bakterieller DNA im Blut von gesunden Menschen (McLaughlin et al., 2002; Nikkari et al., 2001).

Die Detektionsniveaus lagen bei 10^1 bzw. 10^3 Bakterien pro Ansatz für E. coli bzw. Staphylococcus aureus aus Einzelkulturen. Die Nachweisgrenze (LOD) von anderen Bakterienarten lag zwischen 10^2 und 10^3. Veröffentlichte Daten, die von einer höheren Sensitivität aus Einzelkulturen sprachen, beruhten oft auf Verdünnungen von DNA-Konzentraten, und es wurde eine viel kleinere Zielsequenz amplifiziert, die nur die Feststellung der Anwesenheit von Bakterien gestattete (Wilson et al., 2002).

Bei versetztem Blut wurde eine LOD für das erfindungsgemäße Protokoll und den erfindungsgemäßen Mikroarray von 10 bis 10^5 Bakterien pro ml Blut gefunden. Die höhere LOD von versetzten Blutproben gegenüber Einzelkulturen könnte jedoch auf PCR-Inhibitionskomponenten im Blut zurückgehen (Al-Soud et al., 2000, 2001). Eine zusätzliche DNA-Reinigung kann die Menge dieser Inhibitoren reduzieren, aber hohe Gehalte an restlicher Human-DNA machen eine niedrigere LOD weiterhin schwierig.

Die meisten auf Mikroarray-Technologie basierenden Identifizierungsverfahren wurden ohne LOD-Bestimmung veröffentlicht. Aussagen zur Sensitivität bei Blutproben beruhten üblicherweise auf PCR- und RT-PCR-Versuchen. Die LOD lag hier zwischen 40 und 2000 CFU pro ml versetztem Blut, obwohl die Berücksichtigung von statischen Bakterien diese Zahlen noch erhöhen könnte. Für eine Standard-16S-rRNA-PCR betrug die LOD 10^4 bei E. coli und 10^5 bei Staphylococcus aureus pro ml Blut. Diese Untersuchungen zielten jedoch nur auf die Bestätigung der Anwesenheit von Bakterien in Blut ohne Identifizierung derselben ab (Jordan und Durso, 2005; Heininger et al., 2004).

Für diesen Test können verschiedene viel versprechende Ansätze zur Erhöhung der Signalstärke und weiteren Reduktion der LOD von Mikroarray-Analysen angewendet werden. So wurde bereits

NACHGEREICHT

beispielsweise der Einsatz einer kontinuierlich und diskontinuierlich rotierenden Mikrokammer vorgeschlagen (Vanderhoeven et al., 2005; Peplies et al., 2003; Liu et al., 2001; Francois et al., 2003).

Es wurde eine Datenbank erstellt, die als Klassifizierer für das angewendete statistische Verfahren dient. Bei der Evaluierung werden Mustererkennungs- und Maschinenlernalgorithmen implementiert. Beim k-Nächste-Nachbarn-Verfahren wird eine genaue Identifizierung innerhalb einer voll automatisierten Plattform ausgeführt. Außerdem steht ein Software-Package in Entwicklung, das die Flexibilität einer nachträglichen Anbringung von Einzelsonden, individuellen Arten, Artengruppen oder auch einen Austausch des ganzen Klassifizierers mitumfasst. Eine Erweiterung des Klassifizierers durch Hinzufügung weiterer Hybridisierungsergebnisse erhöht die Spezifität der Identifizierung wegen geringerer Misinterpretationsmöglichkeiten aufgrund von falsch negativen Signalen oder Kreuzhybridisierungen (insbesondere für die Arten Proteus und Acinetobacter). Mit der Software werden die automatische Verarbeitung von gpr-Dateien aus der Genepix-Software und die Wiederfindung von Gattungs- und Artnamen möglich sein.

Darüber hinaus werden Empfehlungen für entsprechenden Antibiotikabehandlungen aufgrund der statistischen Bewertung von periodisch upgedateten Informationen über Antibiotikaresistenz gegeben.

In den vorliegenden Beispielen ist ein rasches und sensitives Verfahren für die auf DNA basierende Identifizierung von klinisch relevanten Pathogenen beschrieben, die Blutstrominfektionen verursachen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist dieser Mikroarray genauso sensitiv bei der Identifizierung von Pathogenen in geringen Konzentrationen bis zu 10 Bakterien pro ml. Gestützt auf die Analyse von Signalmustern wurde eine Spezifität von 100 % bei den Gattungen und über 96 % bei den Arten festgestellt. Das zeigt, dass ein Identifizierungswerkzeug auf Basis des 16S-rRNA-Markergens einen wirksamen Ansatz für die klinische Laborroutine bietet. Im Vergleich zu Standardverfahren, bei denen Blutkulturen verwendet werden, kann eine Mikroarray-Identifizierung innerhalb von sechs Stunden durchgeführt werden, wobei auch multimikrobielle Infektionen berücksichtigt werden. Darüber hinaus kann die Anzahl der identifizierbaren Organismen leicht auf neue Pathogene ausgeweitet werden.

NACHGEREICHT

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt in der Schaffung von multispezifischen Sonden, die spezifisch mehr als eine Art innerhalb der Familie der Enteroceae identifizieren, insbesondere Sonden, die spezifisch Enterobacter, Klebsiella und Citrobacter identifizieren.

NACHGEREICHT

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Austrian Research Centers GmbH - ARC

<120> Pathogen-Identifizierung

<130> R 48016

<160> 80

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 38
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer

<400> 1
taatacgact cactatagag agtttgatcm tggctcag 38

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer

<400> 2
tacggytacc ttgttacgac tt 22

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer

<400> 3
taatacgact cactatag 18

<210> 4
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer

<400> 4
tccgcaggtt cacctac 17

<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer

<400> 5
caagtctggt gccagca 17

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 6
caagctacct tccccgct 19

<210> 7
<211> 36
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 7
gtaacgtcca ctatctctag gtattaacta aagtag 36

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 8
gcagtatcct taaagttccc atccgaaat 29

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 9
tcccagtatc gaatgcaatt cctaagtt 28

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 10
gaaagttctt actatgtcaa gaccaggtaa g 31

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 11
cttaacccgc tggcaaataa ggaaaa 26

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 12
gagatgttgt cccccactaa taggc 25

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 13
tgacttaatt ggccacctac gcg 23

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 14
cccatactct agccaaccag tatcg 25

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 15
cgctgaatcc agtagcaagc tac 23

<210> 16
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 16
gtccactatc ctaaagtatt aatctaggta gcct 34

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Sonde

<400> 17
ccgaagtgct ggcaaataag gaaa 24

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 18
gctcctctgc taccgttcg 19

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 19
ccacaacgcc ttcctcctcg 20

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 20
tctgcgagta acgtcaatcg ctg 23

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 21
cgggtaacgt caattgctgt gg 22

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 22
cgagactcaa gcctgccagt at 22

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 23
gcgggtaacg tcaattgctg c 21

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 24
ctacaagact ccagcctgcc a 21

<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 25
taccccctc tacaagactc ca 22

<210> 26
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 26
ggttattaac cttaacgcct tcctcct 27

<210> 27
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 27
caatcgccaa ggttattaac cttaacgc 28

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 28
tctgcgagta acgtcaatcg cc 22

<210> 29
<211> 20

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 29
gctctctgtg ctaccgctcg 20

<210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 30
gcatgaggcc cgaaggtc 18

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 31
tcgtcacccg agagcaagc 19

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 32
ccagcctgcc agtttcgaat g 21

<210> 33
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 33
gtaacgtcaa tgagcaaagg tattaacttt actcccttcc 40

<210> 34
<211> 39
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 34
ccgaaggcac attctcatct ctgaaaactt ccgtggatg 39

<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 35
gccatcaggc agatccccat ac 22

<210> 36
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 36
cttgacacct tcctcccgac t 21

<210> 37
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 37
catctgactc aatcaaccgc ctg 23

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 38
gtcagccttt accccaccta ctag 24

<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 39
gggtattaac cttatcacct tcctccc 27

<210> 40
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 40
ccaaccagtt tcagatgcaa ttccc 25

<210> 41
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 41
gttcaagacc acaacctcta aatcgac 27

<210> 42
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 42
ctgctttggt ccgtagacgt ca 22

<210> 43
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 43
ttcccgaagg cactcctcta tctcta 26

<210> 44
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 44
gatttcacat ccaacttgct gaacca 26

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 45
tctccttaga gtgcccaccc g 21

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 46
cgtggtaacc gtccccttg 20

<210> 47
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 47
ctcccctgtg ctaccgctc 19

<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 48
caccaccttc ctcctcgctg 20

<210> 49
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 49
gagtaacgtc aattgatgag cgtattaagc 30

<210> 50
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 50
agctgccttc gccatggatg ttc 23

<210> 51
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 51
tgggattggc ttaccgtcgc 20

<210> 52
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Sonde

<400> 52
ctcctccttc agcgttctac ttgc 24

<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 53
ggtccatctg gtagtgatgc aagtg 25

<210> 54
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 54
tcttgcactc aagttaaaca gtttccaaag 30

<210> 55
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 55
attactaaca tgcgttagtc tctcttatgc g 31

<210> 56
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 56
ctggttagtt accgtcactt ggtgg 25

<210> 57
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 57
ttctccagtt tccaaagcgt acattg 26

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 58
caagctccgg tggaaaaaga agc 23

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 59
catccatcag cgacacccga 20

<210> 60
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 60
acttcgcaac tcgttgtact tccc 24

<210> 61
<211> 39
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 61
ccgtcaaggg atgaacagtt actctcatcc ttgttcttc 39

<210> 62
<211> 39
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 62
attagcttag cctcgcgact tcgcaactcg ttgtacttc 39

<210> 63
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 63
ctccggtgga aaaagaagcg t 21

<210> 64
<211> 16

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 64
ctcccggtgg agcaag 16

<210> 65
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 65
ctctatctct agagcggtca aaggat 26

<210> 66
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 66
cagtcaacct agagtgccca act 23

<210> 67
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 67
agctgccctt tgtattgtcc att 23

<210> 68
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 68
atgggatttg catgacctcg cg 22

<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 69
ccgtctttca cttttgaacc atgc 24

<210> 70
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 70
agctaatgca gcgcggatc 19

<210> 71
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 71
tgcacagtta cttacacata tgttctt 27

<210> 72
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 72
aaggggaaaa ctctatctct agaggg 26

<210> 73
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 73
gggtcagagg atgtcaagat ttgg 24

<210> 74
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 74
atctctagag gggtcagagg atgt 24

<210> 75
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 75
ccactcctct ttccaattga gtgca 25

<210> 76
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 76
gccatgcggc ataaactgtt atgc 24

<210> 77
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 77
cccgaaagcg cctttcactc tt 22

<210> 78
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 78
ggacgttcag ttactaacgt ccttg 25

<210> 79
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 79
ccagcgagta taagccttgg cc 22

<210> 80
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Sonde

<400> 80
tagccttttt ggcgaaccag g 21

010194

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Identifizierung von mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen in einer Blutprobe, umfassend die folgenden Schritte:
a) Vorsehen einer Blutprobe,
b) Lysieren der mikrobiellen Pathogene und Durchführen einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA, wobei oder worauf die amplifizierten Nukleinsäuren markiert werden,
c) Kontaktieren der markierten amplifizierten Nukleinsäuren aus Schritt b) mit einem Mikroarray umfassend immobilisierte Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA auf definierten Bereichen auf der Oberfläche des Mikroarrays,
d) Nachweisen der Bindung von einer oder mehr Art(en) der markierten amplifizierten Nukleinsäuren an eine Sonde durch Nachweisen einer markierten amplifizierten Nukleinsäure, die spezifisch an den Mikroarray gebunden ist, und
e) Identifizieren eines mikrobiellen Pathogens von Blutstrominfektionen in der Blutprobe durch Korrelieren der nachgewiesenen Bindung der markierten amplifizierten Nukleinsäuren mit den definierten Bereichen der immobilisierten Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA mittels PCR durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA mit universellen Primern für die für 16S- oder 18S-rRNA codierende mikrobielle DNA, vorzugsweise mit nicht mehr als acht Primern (4 Forward-, 4 Reverse-Primern), noch bevorzugter mit nicht mehr als sechs Primern (3 Forward-, 3 Reverse-Primern), vorzugsweise mit nicht mehr als vier Primern (2 Forward-, 2 Reverse-Primern), durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekenn-

NACHGEREICHT

010194

zeichnet, dass die Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA mit den Primern gemäß Seq. ID Nos. 1, 2, 4 und 5 durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen Schritt a) und Schritt b) ein Filtrationsschritt durchgeführt wird, worin die Probe durch ein Filter filtriert wird, das in der Blutprobe vorhandene Leukozyten zurückhält, die mikrobiellen Pathogene aber nicht zurückhält.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die mikrobiellen Pathogene Humanpathogene sind.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Markieren der Nukleinsäuren durch Primerverlängerung, in-vitro-Transkription, Biotin-Streptavidin-Markieren, isothermisches Markieren auf Klenow-Fragment-Basis oder direktes Nukleinsäure-Amplifikationsmarkieren, vorzugsweise durch direktes PCR-Markieren, erfolgt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die amplifizierten markierten Nukleinsäuren direkt ohne Reinigungs- oder Waschschritt nach der Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion auf den Mikroarray aufgebracht werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroarray immobilisierte Sonden für mikrobielle DNA umfasst, die für 16S- oder 18S-rRNA aus mindestens zehn, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20, der folgenden mikrobiellen Pathogene von Blutstrominfektionen codiert: Escherichia coli (ATCC 35218, EC5, EC17, 81617, 68933, 68307), Enterobacter aerogenes (DSMZ 30053, 12676), Enterobacter cloacae (26385, 79232, 93840, 12720, 74892), Klebsiella pneumoniae (25809, 85813, 26385, 13253), Klebsiella oxytoca (26785, 26384, 73739, 26786, 96633), Citrobacter koseri (DSMZ 4595), Citrobacter freundii (80324, 73489), Staphylococcus aureus (ATCC 6538, ATCC 25923, ATCC 29213, 83799, 82913, 73237, 12998), Staphylococcus epidermidis (ATCC 14990, 73711, 35989, 80320, 13000, 77504, 79510), Enterococcus faecalis (ATCC 29212, EF4, 81239, 83776, 27520), Enterococcus faecium (DSMZ 20477), Streptococcus

NACHGEREICHT

010194

pneumoniae (DSMZ 25500), Streptococcus pyogenes (ATCC 19615, 10388), Proteus mirabilis (26786, ATCC 14153, 27761, 97656, 71913), Proteus vulgaris (DSMZ 13387, 80196), Serratia marcescens (DSMZ 30121), Morganella morganii (DSMZ 6675, 12615), Pseudomonas aeruginosa (26178, 12950, 26535, 68961, 74352), Stenotrophomonas maltophilia (DSMZ 50170, 26394, 26396), Acinetobacter baumannii (DSMZ 30007), Acinetobacter lwoffii (DSMZ 2403, 75496), Acinetobacter radioresistens (DSMZ 6976), Acinetobacter johnsonii (DSMZ 6963), Candida albicans (ATCC 10231, 21179, 27184, 96917, 96635), Candida parapsilosis (4344).

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroarray mindestens einen Stamm von mindestens 10 verschiedenen Arten, vorzugsweise mindestens 15 verschiedenen Arten, insbesondere mindestens 20 verschiedenen Arten, von den folgenden Arten umfasst: Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Citrobacter koseri, Citrobacter freundii, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Serratia marcescens, Morganella morganii, Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Acinetobacter baumannii, Acinetobacter lwoffii, Acinetobacter radioresistens, Acinetobacter johnsonii, Candida albicans, Candida parapsilosis.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroarray immobilisierte Sonden umfasst, die multispezifisch sind.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroarray mindestens 10, vorzugsweise mindestens 20, noch bevorzugter mindestens 30, insbesondere mindestens 40, multispezifische immobilisierte Sonden umfasst.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 40 %, insbesondere mindestens 50 %, der auf dem Mikroarray immobilisierten Sonden multispezifische Sonden sind.

NACHGEREICHT

010194

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Korrelieren von Schritt e) unter Verwendung der Informationen über die Bindung von markierten Nukleinsäuren an auf der Oberfläche des Mikroarray immobilisierte multispezifische Sonden durchgeführt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Korrelieren von Schritt e) unter Verwendung von vorausgesagten Hybridisierungsmustern mit gewichteten Nichtübereinstimmungen durchgeführt wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroarray mindestens 5, vorzugsweise mindestens 10, noch bevorzugter mindestens 20, noch mehr bevorzugt mindestens 30, insbesondere mindestens 50, Sonden gemäß Seq. ID Nos. 6 bis 80 umfasst.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden auf dem Mikroarray so ausgewählt sind, dass sie mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 90 %, noch bevorzugter mindestens 95 %, insbesondere mindestens 98%, der mikrobiellen, insbesondere bakteriellen, Pathogene repräsentieren, die mit Sepsis in Verbindung stehen oder vermeintlich in Verbindung stehen.

18. Verfahren zum Identifizieren von mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen in einer Blutprobe, umfassend die folgenden Schritte:
a) Vorsehen einer Blutprobe (die im Verdacht steht, solche mikrobiellen Pathogene zu enthalten),
b) Lysieren der mikrobiellen Pathogene (wenn vorhanden) und Durchführen einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion an der für 16S- oder 18S-rRNA codierenden mikrobiellen DNA,
c) Kontaktieren der amplifizierten Nukleinsäuren aus Schritt b) mit einem Mikroarray umfassend immobilisierte Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA auf definierten Bereichen auf der Oberfläche des Mikroarrays,
d) Nachweisen der Bindung von einer oder mehr Art(en) der amplifizierten Nukleinsäuren an eine Sonde durch Nachweisen einer

NACHGEREICHT

010194

speziell an den Mikroarray gebundenen amplifizierten Nukleinsäure mit Hilfe einer Mikroarray-Einrichtung, die das Bindungsereignis einer amplifizierten Nukleinsäure an eine immobilisierte Sonde nachweist, und

e) Identifizieren eines mikrobiellen Pathogens von Blutstrominfektionen in der Blutprobe durch Korrelieren der nachgewiesenen Bindung der amplifizierten Nukleinsäuren mit den definierten Bereichen der immobilisierten Sonden für für 16S- oder 18S-rRNA aus mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen codierende mikrobielle DNA.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die speziellen Ausführungsformen nach einem der Ansprüche 2 bis 17 mit der Ausnahme angewendet werden, dass anstelle von markierten amplifizierten Nukleinsäuren unmarkierte Nukleinsäuren verwendet werden.

20. Mikroarray nach einem der Ansprüche 1 und 9 bis 19.

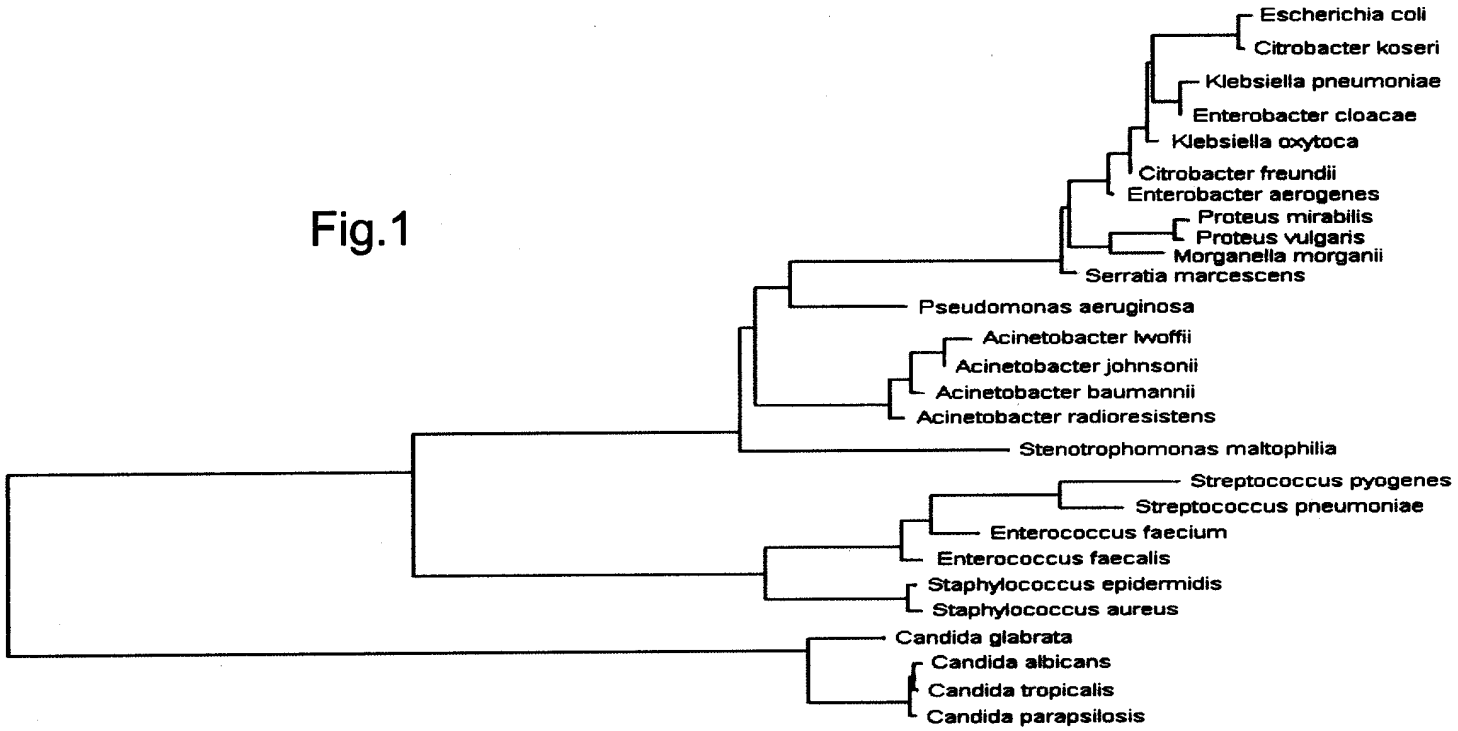
21. Testset umfassend ein Probenhalterungsmittel für eine Blutprobe, einen Mikroarray nach Anspruch 20 und gegebenenfalls Primer wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 definiert.

22. Testset nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass es Primer enthält, die spezifisch für die Amplifikation von mikrobieller DNA sind, welche für 16S- und 18S-rRNA der Pathogene wie in einem der Ansprüche 1, 9 oder 10 definiert codiert.

23. Verwendung eines Mikroarrays nach Anspruch 20 oder eines Testsets nach Anspruch 21 oder 22 zur Identifizierung von mikrobiellen Pathogenen von Blutstrominfektionen in einer Blutprobe, insbesondere zur Überwachung des Bluts eines Sepsis-Patienten oder eines Sepsis-Risikopatienten.

NACHGEREICHT

Fig.1



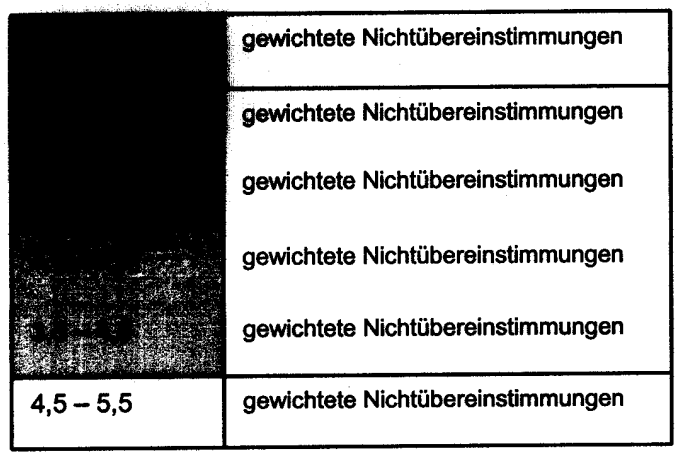
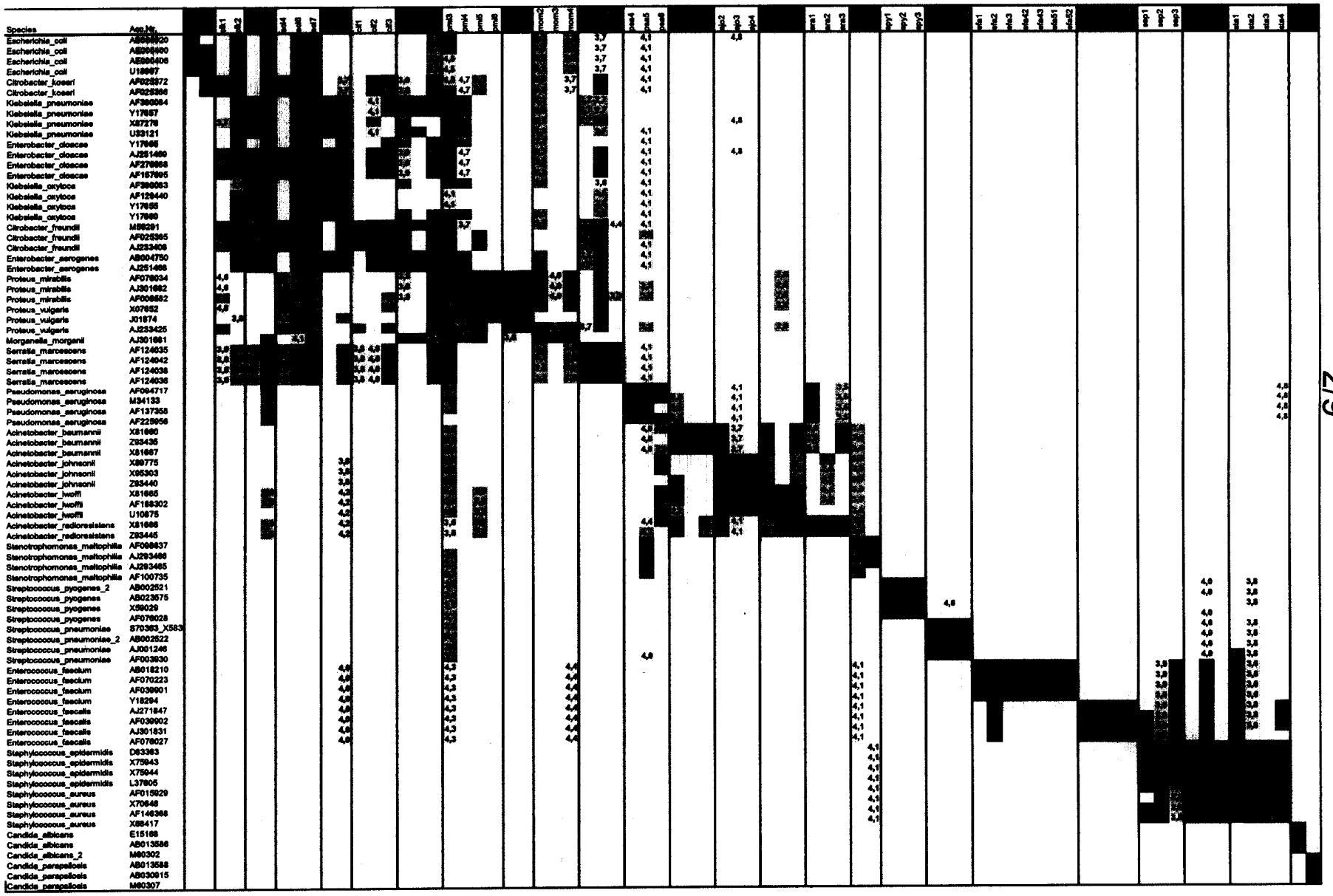


Fig.2B

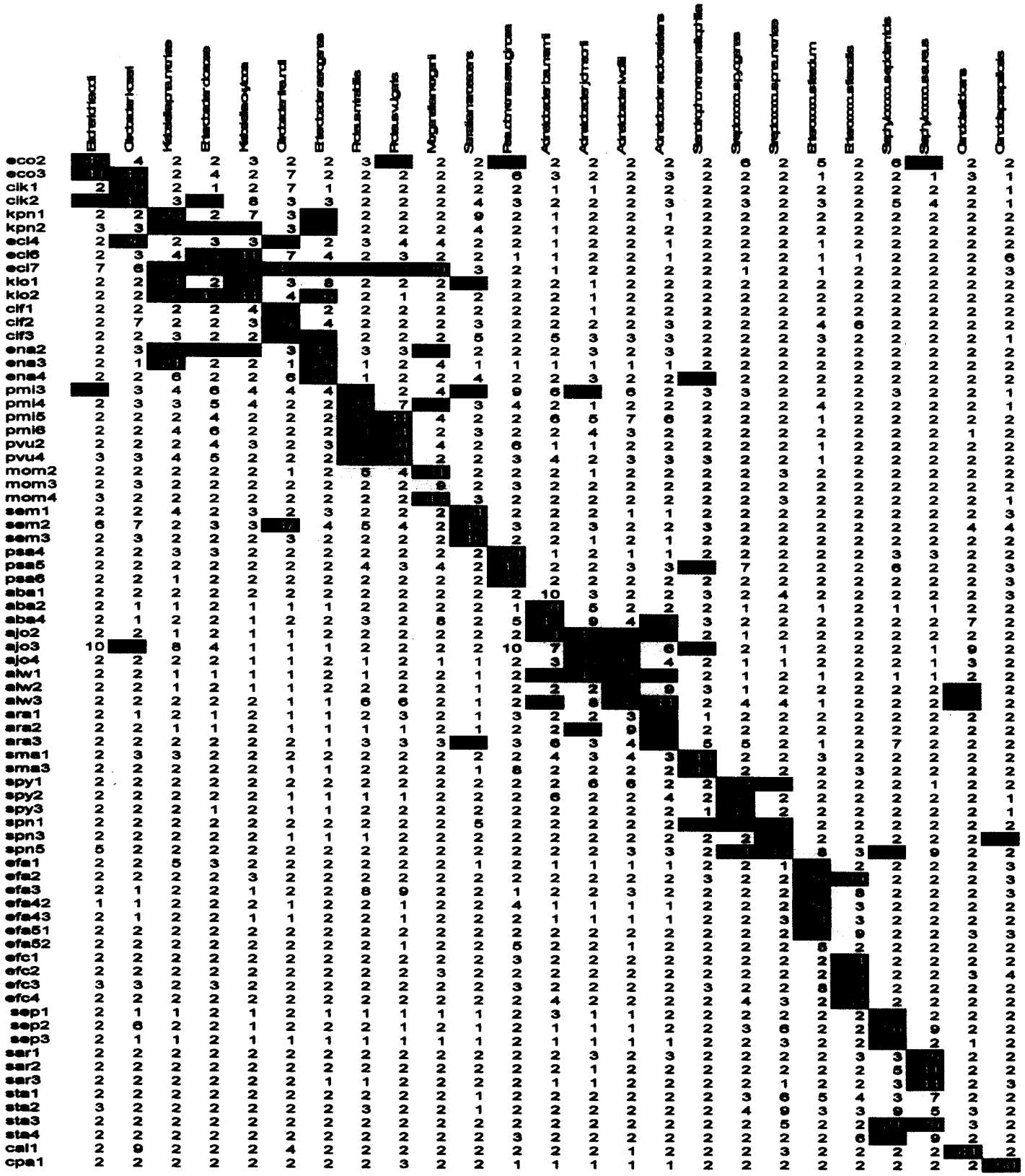
NACHGEREICHT

Fig.2



NACHGEREICHT

Fig.3



NACHGEREICHT

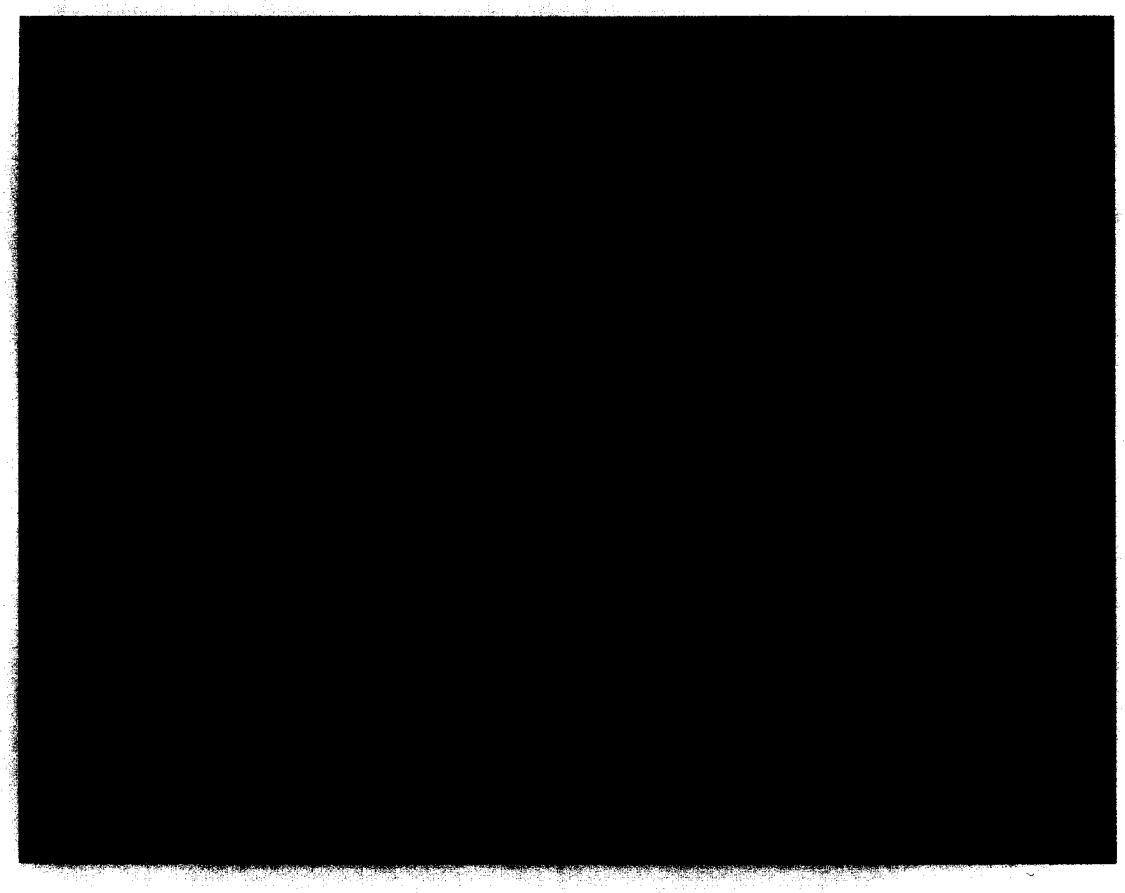


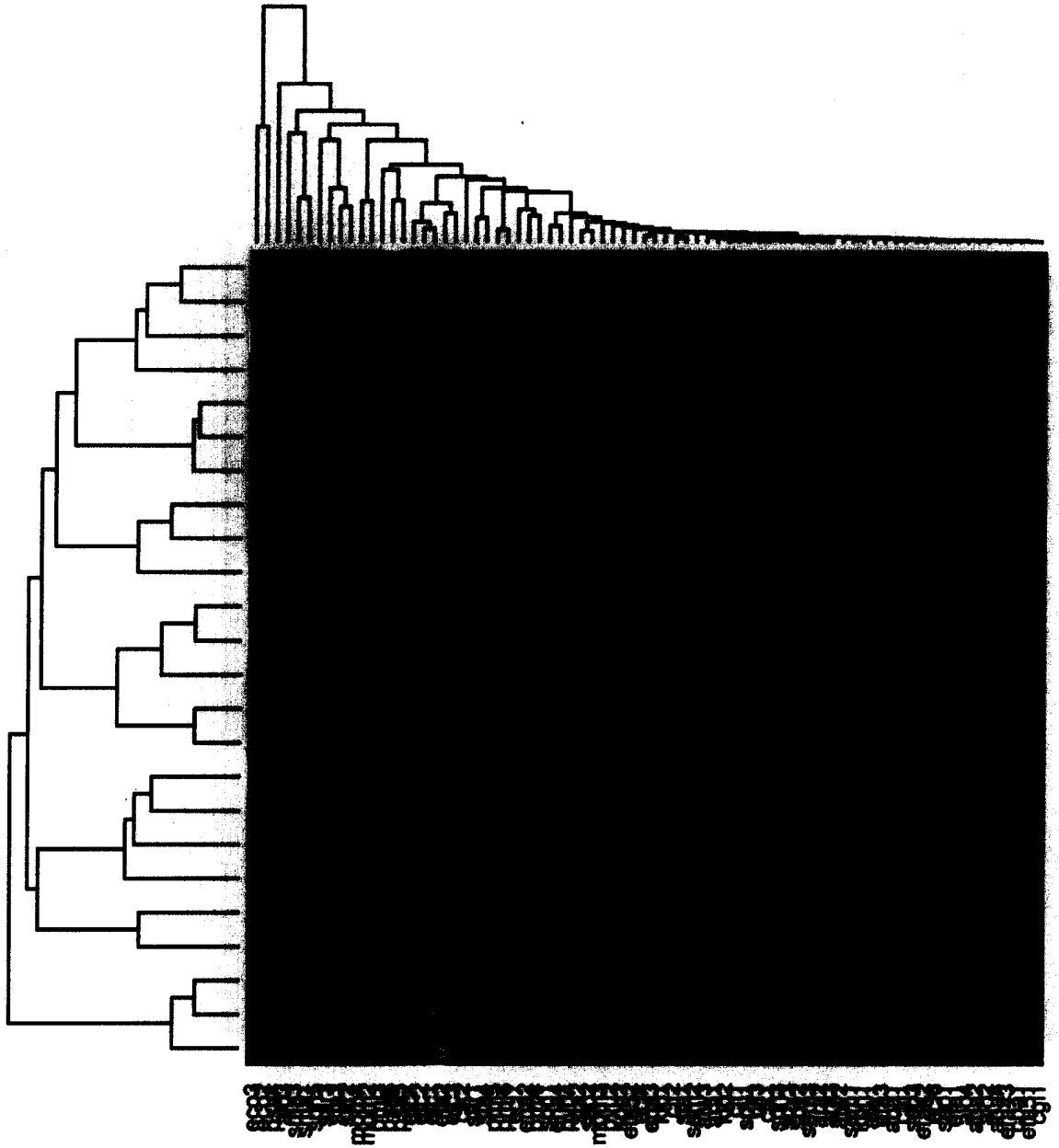
Fig.4

NACHGEREICHT

Fig.5A

Fig.5B

NACHGEREICHT



Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas aeruginosa,
Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas malthophilia
Escherichia coli,
Escherichia coli,
Escherichia coli,
Staphylococcus aureus, Stenotrophomonas malthophilia
Stenotrophomonas malthophilia,
Escherichia coli, Stenotrophomonas malthophilia
Staphylococcus aureus, Escherichia coli
Staphylococcus aureus, Escherichia coli
Staphylococcus aureus, Escherichia coli
Staphylococcus aureus,
Staphylococcus aureus,
Escherichia coli, Morganella morganii
Morganella morganii,
Pseudomonas aeruginosa, Morganella morganii
Stenotrophomonas malthophilia, Morganella morganii
Escherichia coli, Proteus mirabilis
Proteus mirabilis,
Escherichia coli, Enterococcus faecalis
Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis
Enterococcus faecalis,

Fig.6

NACHGEREICHT

Fig.7

Fig.8

NACHGEREICHT

NACHGEREICHT

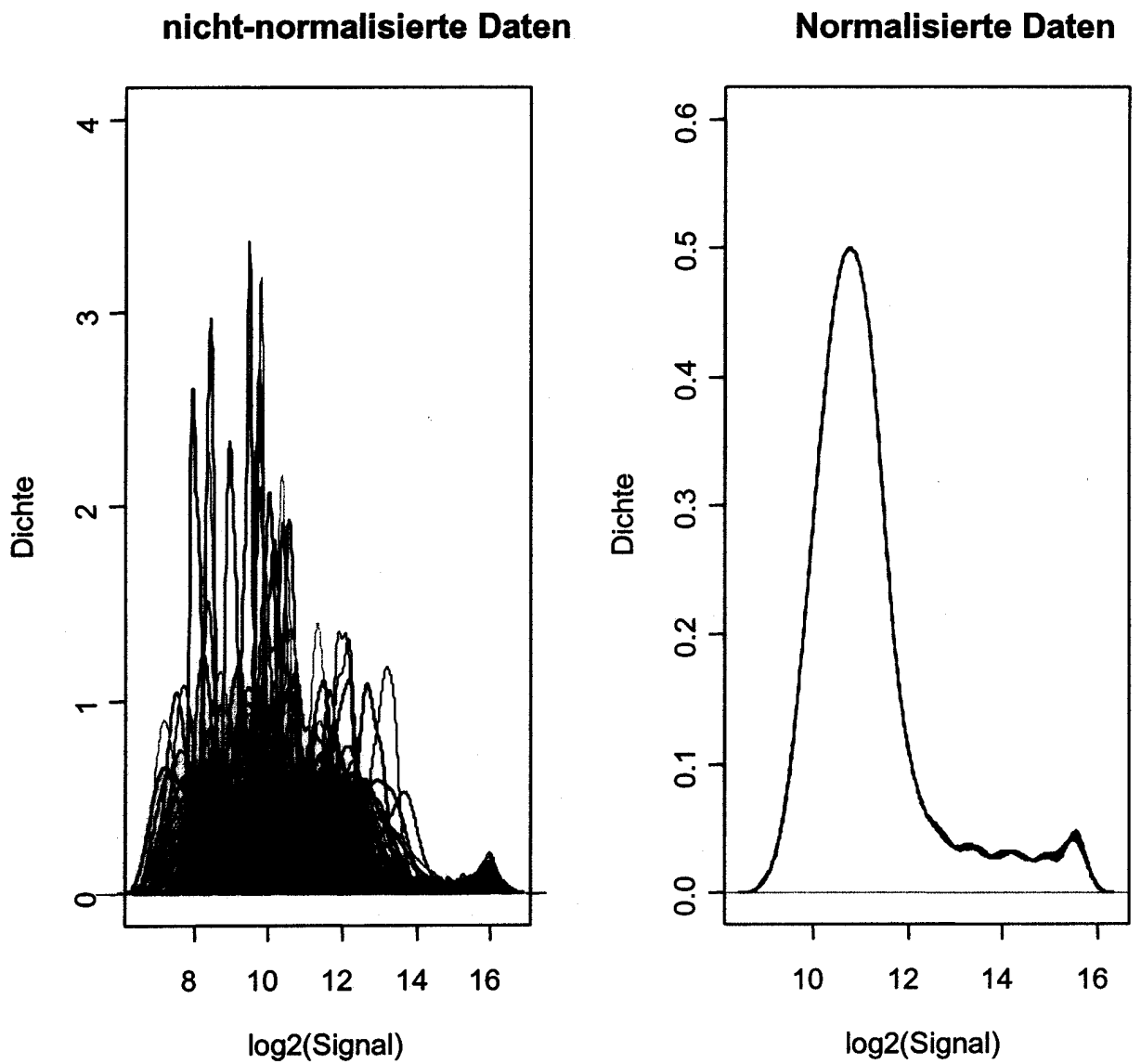


Fig.9



Fig.10

NACHGEREICHT

Recherchenbericht zu **A 1148/2006**
Technische Abteilung 4A

österreichisches patentamt

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: C12Q1/68B10A, C12Q1/68M10
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): C12Q
Konsultierte Online-Datenbank: STN-registry, WPI, EPODOC, CAS
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am **21. September 2006** eingereichten Ansprüchen **1-23** erstellt.

Kategorie*)	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
Y	WO 2001/007648 A1 (ARTUS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK UND ENTWICKLUNG MBH) 1. Februar 2001 (01.02.2001) *Beispiele, Tabelle 1, Ansprüche 1, 9, 14, 16*	1-3, 6-15, 17-23
	--	
Y	US 2004/0023209 A1 (JONASSON) 5. Februar 2004 (05.02.2004) *Beispiele, Ansprüche 1, 5, 19*	1-3, 6-15, 17-23
	--	
Y	DE 19713556 A1 (R. FISLAGE) 8. Oktober 1998 (08.10.1998) *Anspruch 1*	1-3, 6-15, 17-23

Datum der Beendigung der Recherche:	☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt	Prüfer(in):
11. Mai 2007		Mag. MOSSER

*) **Kategorien** der angeführten Dokumente:

- **X** Veröffentlichung **von besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- **Y** Veröffentlichung **von Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist.
- **A** Veröffentlichung, die den **allgemeinen Stand der Technik** definiert.
- **P** Dokument, das **von Bedeutung** ist (Kategorien X oder Y), jedoch **nach dem Prioritätstag** der Anmeldung **veröffentlicht** wurde.
- **E** Dokument, das **von besonderer Bedeutung** ist (Kategorie X), aus dem ein **älteres Recht** hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- **&** Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.