

Aus dem Hygieneinstitut der Universität Tübingen  
Abteilung Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene  
Abteilungsleiter: Professor Dr. K. Botzenhart

**Der Einfluss von humanen Serum-DNasen auf den  
Nachweis von durch Antibiotika abgetöteten *E. coli* im Blut  
mittels PCR**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorgrades  
der Medizin

der  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Almut Müller-Schauenburg  
aus Tübingen

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Unertl

Meiner Schwester,  
meiner Mutter und  
meinem Vater gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Sepsis.....	6
1.2 Diagnostik.....	8
1.2.1 Die Blutkultur .....	9
1.2.2 Die PCR.....	11
1.3 DNase I.....	12
1.4 Fragestellung.....	13
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Bakterien .....	14
2.1.1 Herstellen einer Übernachtskultur .....	14
2.1.2 Waschen der Bakterien .....	14
2.1.3 Einstellen der Konzentrationen.....	14
2.1.4 Vorversuch zur Ermittlung der Mindestdosis von Cefotaxim zur kompletten Abtötung von $10^6$ <i>E. coli</i> pro ml .....	15
2.1.5 Vorversuch zur Ermittlung der Mindestdosis von Ciprofloxacin, Imipenem, Gentamicin und Cefotaxim zur vollständigen Abtötung von $10^8$ <i>E. coli</i> pro ml .....	16
2.2 Überprüfen der DNA – Freisetzung nach dem Abtöten durch Antibiotika .....	16
2.2.1 Abtöten der Bakterien.....	17
2.2.2 DAPI-Färbung.....	17
2.2.3 Mikroskopische Auswertung.....	17
2.3 Einfluss von DNasen auf die Detektierbarkeit von <i>E. coli</i> -DNA mittels PCR.....	18
2.3.1 Versuche mit 30 pg gereinigter <i>E. coli</i> -DNA .....	19
2.3.1.1 Einfluss der natürlichen Serum-DNasen.....	19
2.3.1.2 Rekombinante humane DNase I in Serum .....	19
2.3.1.3 Rekombinante humane DNase I in Tris-HCl-Puffer .....	20
2.3.2 Einfluss von DNasen auf die Detektion von abgetöteten <i>E. coli</i> mittels PCR.....	20
2.3.2.1 In Serum und Tris-HCl-Puffer .....	20
2.4 DNA-Isolierung .....	21
2.5 PCR.....	22
2.6 Statistische Auswertung .....	25
3 Ergebnisse.....	26

3.1	Vorversuch zur Ermittlung der Mindestdosis von Cefotaxim zur kompletten Abtötung von $10^6$ <i>E. coli</i> pro ml.....	26
3.2	Vorversuch zur Ermittlung der Mindestdosis von Ciprofloxacin, Imipenem, Gentamicin und Cefotaxim zur kompletten Abtötung von $10^8$ <i>E. coli</i> pro ml.....	26
3.3	Beurteilung der DNA-Freisetzung aus <i>E. coli</i> nach dem Abtöten durch Antibiotika .....	28
3.4	Der Einfluss der Aktivität von DNasen auf die Nachweisbarkeit von <i>E. coli</i> mittels PCR .....	31
3.4.1	Gereinigte <i>E. coli</i> -DNA mit natürlichen Serum-DNasen.....	31
3.4.2	Inkubation gereinigter <i>E. coli</i> -DNA mit rekombinanter humaner DNase I in humanem Serum .....	32
3.4.3	Inkubation gereinigter <i>E. coli</i> -DNA mit rekombinanter humaner DNase I in Tris-HCl-Puffer .....	33
3.4.4	Inkubation von durch Antibiotika abgetöteten <i>E. coli</i> mit rekombinanter humaner DNase I in humanem Serum .....	36
3.4.5	Inkubation von durch Antibiotika abgetöteten <i>E. coli</i> mit rekombinanter humaner DNase I in Tris-HCl-Puffer .....	37
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	38
4	Diskussion .....	39
4.1	Diskussion der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur .....	41
4.2	Schlussfolgerung .....	45
5.	Zusammenfassung .....	46
6.	Literaturverzeichnis .....	47

# 1 Einleitung

## 1.1 Sepsis

In der Intensivmedizin wird man häufig mit der Problematik eines septischen Krankheitsbildes konfrontiert. Die für das septische Krankheitsbild typischen Symptome sind hohes, intermittierendes Fieber mit Schüttelfrost, Leukozytose, Tachycardie, Tachypnoe und ein deutlich reduzierter Allgemeinzustand bis zur Verwirrung. In vielen Fällen kann man abgesehen von diesen unspezifischen Symptomen auch ganz spezifische Symptome beobachten, die direkt von einem klar definierten infektiösen Herd ausgehen [25].

Einer Sepsis liegt definitionsgemäß immer eine Infektion zugrunde [3]. Eine häufige Ursache einer Sepsis ist das Eindringen von Bakterien in die Blutbahn [3], also eine Bakteriämie [8], seltener sind Fungämien oder Virämien [3]. Das Spektrum der Erreger hat sich im Laufe des 20. Jahrhunderts deutlich gewandelt. So spielten zu Beginn des Jahrhunderts die pyogenen, grampositiven Keime wie *Staphylokokkus aureus* und *Streptokokkus pneumoniae* die größte Rolle [19]. Seit Einführung von Antibiotika um 1950 gab es eine deutliche Zunahme der Infektionen mit gramnegativen Keimen wie *Escherichia coli*, anderen *Enterobacteriaceae*, *Proteus* und *Klebsiellae*. Seit 1980 gibt es wieder eine Zunahme der Infektionen mit *Staphylokokkus aureus*, wobei es sich hierbei um Stämme handelt, die Resistenzen gegen die gängigen Antibiotika entwickelt haben [19]. Ganz besonders gefürchtet ist der gegen Methicillin resistente Stamm des *Staphylokokkus aureus*, der MRSA. Momentan sind die häufigsten Erreger der bakteriellen Sepsis gramnegative Keime wie *Escherichia coli*, andere *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas aeruginosa* [19] [38]. Noch sind grampositive Bakterien wie *Staphylokokkus aureus* oder *Streptokokkus pneumoniae* seltener nachzuweisen.

Die Invasion der Blutbahn durch Keime läuft meistens über einen der folgenden zwei Mechanismen ab: erstens über die Drainage eines infektiösen Herdes via

Lymphsystem in die Blutbahn, zweitens direkt von außen über Verletzungen wie Punktionsstellen, zum Beispiel bei Missbrauch von i. v. Drogen oder iatrogen [25]. Häufige Sepsisherde sind der Urogenitaltrakt, der HNO-Bereich und die Lunge. Eine primär auf einen bestimmten Fokus begrenzte Infektion, wie beispielsweise eine Pneumonie, kann dann sekundär in die Blutbahn streuen und so zu einer systemischen Infektion, einer Sepsis, führen. Außerdem kommt es vor, dass durch den schlechten Allgemeinzustand eines Patienten die im Körper vorgesehenen natürlichen Barrieren für Keime nicht mehr funktionieren und es zum Beispiel beim Fallen der Mukosabarriere zu einer Durchwanderungsperitonitis kommt. Eine Bakteriämie bedeutet für den Patienten in jedem Fall ein hohes Mortalitätsrisiko, die Prognose verschlechtert sich rapide.

Für sepsisähnliche Krankheitsbilder, das sogenannte systemic inflammatory response syndrome (SIRS), gibt es abgesehen von Infektionen auch andere, nicht infektiös bedingte Ursachen wie systemische Reaktionen auf lokalisierte Erkrankungen, zum Beispiel Verbrennungen oder Pankreatitiden. Sie sind klinisch einer Sepsis sehr ähnlich und müssen deshalb diagnostisch klar abgegrenzt und entsprechend anders behandelt werden. Die Unterteilung dieses großen Symptomkomplexes soll in Abb. 1 verdeutlicht werden.

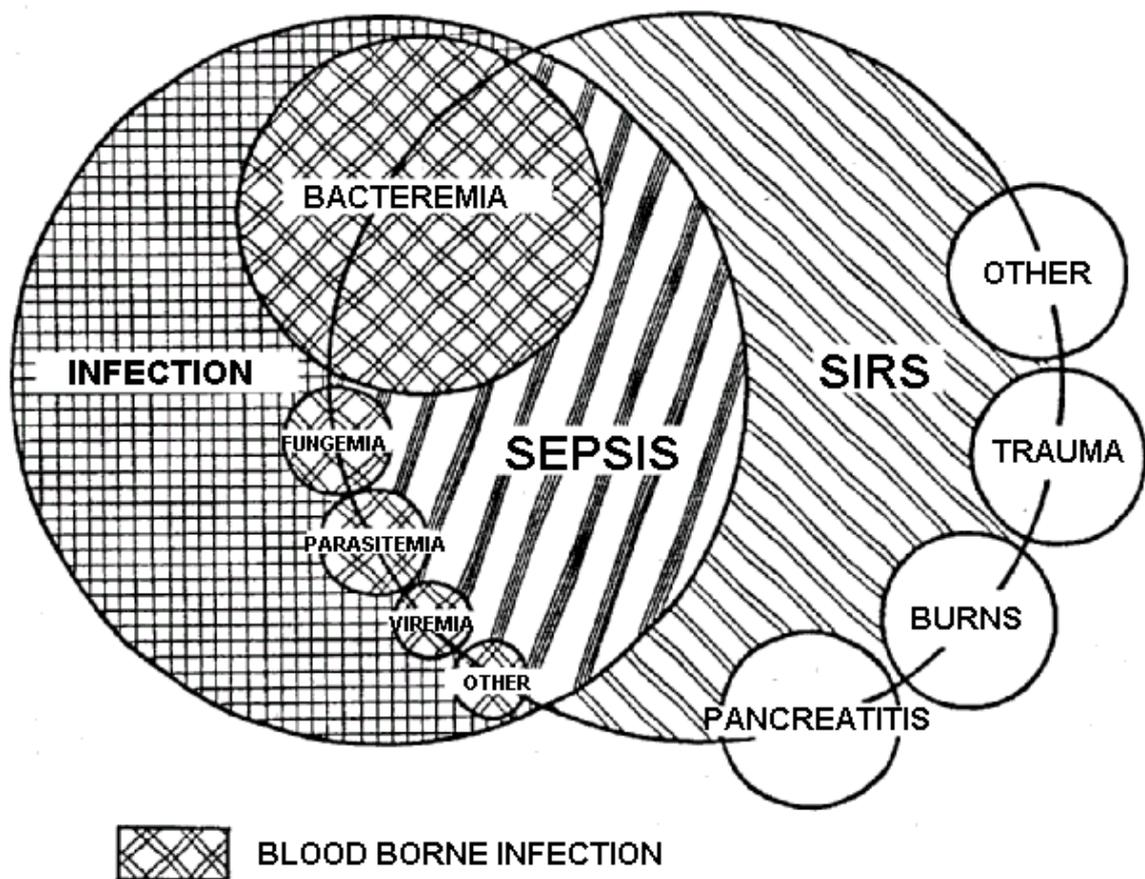


Abb. 1: Der Zusammenhang zwischen systemischer inflammatorischer Reaktion (SIRS), Sepsis und Infektion. (aus „Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the use of Innovative Therapies in Sepsis von Bone et al. [3])

## 1.2 Diagnostik

Im Falle einer Sepsis ist ein schneller Erregernachweis von großer Bedeutung, um schnellstmöglich eine gezielte Antibiotikatherapie einleiten zu können. Bei den Techniken zum Nachweis von Erregern unterscheidet man die klassischen Kulturverfahren, wie die Blutkultur, von den neueren molekularbiologischen Verfahren, wie der 1985 erstmals von Saiki et al. [27] veröffentlichten Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

### 1.2.1 Die Blutkultur

Bis heute gilt die Blutkultur als der Goldstandard für den Nachweis von Bakteriämien [32, 36, 37, 41]. Dabei werden 10–30 ml Vollblut in ein geeignetes Blutkulturmedium gegeben und bei 37°C bebrütet. Die Blutabnahme sollte idealerweise während des Fieberanstiegs stattfinden, da in diesem Moment die erwartete Bakterienlast am höchsten ist [25]. Die Bebrütung erfolgt jeweils sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen. Man detektiert die Bakterien entweder über einen Ausstrich der Probe auf einem geeigneten Kulturmedium, oder über den heute eher üblichen Nachweis von Stoffwechselprodukten des jeweiligen Keims, wie beispielsweise der CO<sub>2</sub>-Produktion. Fällt die Kultur positiv aus, so ist es durch weiteres Anzüchten möglich, den Keim genau zu identifizieren und ihn auf sein Resistenzverhalten gegenüber Antibiotika zu testen. Allerdings liefern nur 4% - 12% aller Blutkulturen ein positives Ergebnis [15, 26]. Dies führt zu der Vermutung, dass man es häufig mit falsch negativen Ergebnissen zu tun hat.

Der Bakteriennachweis mittels Blutkultur hat einige problematische Punkte. Für einen positiven Nachweis werden vermehrungsfähige Mikroorganismen in einer Konzentration von mindestens 1 bis 10 colony forming units (CFU) pro ml Blut benötigt. Diese Voraussetzung ist bei erwachsenen Patienten nicht immer erfüllt [25]. In einer Studie von Henry et al. [12], der das Lyse-Zentrifugations-Verfahren anwandte, wurde bei 62% der Patienten mit einer durch *E. coli* verursachten Bakteriämie eine Keimzahl von < 1 CFU pro ml gefunden, ebenso bei 55% der durch *P. aeruginosa* verursachten Bakteriämien. Bei diesem Verfahren werden die zellulären Blutbestandteile lysiert, dann wird die Probe zentrifugiert und anschließend wird das Pellet auf einem festen Kulturmedium ausplattiert. Auf diese Weise kann eine höhere Bakterienausbeute erreicht werden als bei der konventionellen Blutkultur [42]. Bei Kindern sind im Vergleich zu Erwachsenen, abhängig vom Alter, höhere Konzentrationen an Bakterien zu finden. So wurden bei Neugeborenen mit *E. coli* Sepsis bei 78% der Patienten durch quan-

titative Blutkulturen Bakterienkonzentrationen von  $> 5$  CFU pro ml Blut gefunden, bei Bakteriämien mit kapselbildenden Bakterien wurden in 43% der Fälle sogar Zahlen von  $>100$  CFU pro ml Blut nachgewiesen [42]. Der Keimnachweis mittels Blutkultur kann bis zu 4 Wochen dauern, da Keime wie *Mycobacteriaceae* und *Rickettsiales* nur sehr langsam wachsen [10]. Dieser Zeitraum erlaubt kein Warten auf die exakte Diagnose. Die antibiotische Therapie wird bereits vor dem Ergebnis der Blutkultur dringend nötig, um die Überlebensprognose des Patienten zu verbessern. Abgesehen von der ohnehin schon niedrigen Bakterienlast sind Bakteriämien oft intermittierend und vorübergehend, deshalb sind der richtige Zeitpunkt und die Wiederholung einer Punktion maßgeblich für eine gute Diagnostik.

Bei Intensivpatienten tritt ein zusätzliches Problem auf, denn ihr Allgemeinzustand ist von vornherein schlecht und ein Warten auf eine positive Kultur würde deshalb in jedem Fall zu lange dauern, um rechtzeitig eine gezielte Therapie einleiten zu können. Auch kommen Patienten häufig bereits ambulant antibiotisch anbehandelt in die Klinik. Blutkulturen eines mit Antibiotika behandelten Patienten sind signifikant seltener positiv (2,2%) als diejenigen von nicht vorbehandelten Patienten (6,4%) [6]. Negative Blutkulturen bei antibiotisch anbehandelten Patienten schließen nicht aus, dass weiterhin eine Keimaussaat in die Blutbahn stattfindet, die in diesem Fall jedoch nicht durch ein Kulturverfahren detektiert werden kann. Das Wachstum von Bakterien in Blutkulturen eines mit Antibiotika behandelten Patienten hängt unter anderem vom Verhältnis der Antibiotikakonzentration zur minimalen inhibitorischen Konzentration (MIK) und vom Kulturmedium ab [20]. Ein Problem ist, dass ein Konzentrationsunterschied der antimikrobiellen Substanz zwischen Blut und Gewebe vorliegt, wobei der Blutspiegel des Patienten durch die intravenöse Gabe des Antibiotikums am höchsten ist. So werden die Bakterien im Blut durch die hohe Antibiotikakonzentration abgetötet, eine Blutkultur fällt also negativ aus. An dem primären Infektionsherd ist die Konzentration des Antibiotikums aber geringer, so dass dieser unter Umständen nicht saniert wird und weiterhin Bakterien in die Blutbahn streuen kann.

Man ist heute auf der Suche nach diagnostischen Möglichkeiten, die die Schwachpunkte der Blutkultur überbrücken.

### 1.2.2 Die PCR

Die PCR ist in der Lage, sehr geringe Mengen an bakterieller DNA nachzuweisen. Es handelt sich um eine Amplifikation von bestimmten Gensequenzen. Diese Methode eignet sich zum spezifischen Nachweis von DNA oder RNA. Voraussetzung ist, dass die Basensequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes bekannt ist. Als Starthilfe für die Amplifikation werden sog. Primer zugegeben, zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes entsprechen. Im ersten Schritt wird die in der Probe enthaltene doppelsträngige DNA durch Temperaturerhöhung denaturiert. Anschließend wird die Probe auf eine Temperatur heruntergekühlt, bei der sich die Primer an die komplementären Sequenzen der DNA anlagern können. Diese doppelsträngigen Bereiche werden von einer hitzestabilen DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) erkannt, die dort ansetzend einen neuen Strang synthetisiert. Die Richtung ist durch die Polarität der DNA vorgegeben. Durch erneutes Erhitzen wird die Amplifikation gestoppt, gleichzeitig wird die neu synthetisierte, doppelsträngige DNA denaturiert und der gesamte Prozess kann von vorne beginnen. Nach 20 bis 40 Zyklen, die von einem sogenannten Cycler automatisch gesteuert werden, wird auf diese Weise ein bestimmtes DNA-Segment millionenfach vermehrt. Dieses Segment kann abschließend beispielsweise durch Gelelektrophorese nachgewiesen und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die PCR konnte bereits ihre Überlegenheit gegenüber der Blutkultur für einen Erregernachweis nach Antibiotikagabe zeigen [11, 43]. Dennoch kommt es auch in der PCR immer noch zu relativ vielen negativen Ergebnissen bei Patienten mit septischem Krankheitsbild [5, 17]. Da ein sicherer Goldstandard zur Detektion von Bakteriämien fehlt, muss man sich die Frage stellen, ob negative

Ergebnisse der PCR tatsächlich auf der Abwesenheit von Keimen beruhen. Ein Problem ist das Vorliegen von Faktoren im Blut, wie dem Porphyrin-Ring des Hämoglobins, da er die Taq-Polymerase bindet und somit die PCR-Reaktion hemmt [13]. Diese Aufgabe ließe sich durch eine sorgfältige DNA-Isolierung lösen. Eine andere mögliche Erklärung für eine geringe Rate positiver PCR-Ergebnisse könnte auch darin liegen, dass durch den Abbau bakterieller DNA in der Blutprobe, zum Beispiel durch humane Serum-DNasen, falsch-negative Ergebnisse zustande kommen.

### **1.3 DNase I**

Die Deoxyribonuklease I (DNase I) ist ein Enzym im menschlichen Serum, das in der Lage ist, doppelsträngige DNA zu Oligonukleotiden abzubauen. Die humane DNase I existiert in Form von unterschiedlichen Isoenzymen und verursacht Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA. Ihre Konzentration ist besonders hoch in den Organen Pankreas, Leber, Niere und einigen Körperflüssigkeiten wie Serum, Urin, Sperma und Speichel [21]. Therapeutisch wird sie bei Mukoviszidose eingesetzt, da sie in der Lage ist, die Viskosität des Sputums zu verringern, das so leichter abgehustet werden kann [1, 33]. Außerdem scheint sie eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des systemischen Lupus erythematoses zu spielen, bei welchem eine verminderte Aktivität der DNase gefunden wird [24]. Es wird vermutet, dass es so zu hohen Spiegeln an frei zirkulierender DNA kommen und daraufhin eine Antikörperbildung gegen DNA angeregt werden könnte [4]. Abgesehen davon geht man davon aus, dass die DNase I beim programmierten Zelltod, der Apoptose eine Rolle spielt. In Geweben mit hohen Raten an Zelluntergang wie z. B. dem Verdauungstrakt wird intrazellulär, perinukleär eine relativ hohe Konzentration des Enzyms gefunden [23].

Die eigentlichen Aufgaben der DNase I im menschlichen Organismus sind zum größten Teil noch unbekannt. So gibt es einige Vermutungen und Studien. Untersucht wurde beispielsweise, in wie weit die DNase I in der Lage ist, menschliches Chromatin oder Phagen DNA zu spalten [24], einige Aktivitäts-

prüfungen wurden auch mit DNA aus Lachshoden durchgeführt [21]. Ihre Möglichkeit, freie bakterielle DNA abzubauen, ist jedoch bisher noch nicht genau unter die Lupe genommen worden. Ein wesentlicher Unterschied zur menschlichen DNA, die in Chromosomen vorliegt, ist die Ringform der bakteriellen DNA. Dadurch könnte die Angriffsmöglichkeit der humanen DNase beeinflusst werden.

#### **1.4 Fragestellung**

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Frage nach dem Schicksal der bakteriellen DNA im Blut, nachdem bei einer Bakteriämie die Bakterien durch Antibiotika abgetötet wurden. Wird sie freigesetzt und durch humane DNasen zerstört, oder verbleibt sie zum größten Teil geschützt in der Bakterienhülle? So soll ermittelt werden, ob die PCR den kulturellen Nachweisverfahren nach erfolgter Antibiotikagabe überlegen ist.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der quantitativen Ermittlung der DNA-Freisetzung aus, durch unterschiedliche Antibiotika abgetöteten, *E. coli*, um zu klären, welcher Anteil der bakteriellen DNA der Zerstörung durch DNasen ausgesetzt ist und welcher Anteil in der Bakterienhülle verbleibt und für eine Diagnostik mittels PCR sicher zur Verfügung steht.

Der zweite Teil der Arbeit untersucht, welchen Einfluss die DNase I auf das PCR-Ergebnis nimmt. Es wird ermittelt, in welchem Gewichtsverhältnis die DNase I zu gereinigter bakterieller DNA oder abgetöteten *E. coli* vorliegen muss, um diese bakterielle DNA so weit zu spalten, dass sie nicht mehr durch eine PCR nachzuweisen ist.

In einem Vorversuch war zu klären, welche Konzentrationen der verwendeten Antibiotika für die Abtötung der Bakterien nötig sind, um die für die Versuche benötigte vollständige Abtötung zu garantieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterien

#### 2.1.1 Herstellen einer Übernachtskultur

Für alle Versuche wurde der Stamm ATCC 11229 des gramnegativen Stäbchens *E. coli* verwendet, welches zur Familie der *Enterobacteriaceae* zählt. Am Vorabend der Versuche wurde eine CFU der *E. coli*-Kultur in einen Dreischickane Kolben gegeben, der 10 ml des Nährmediums Tryptic Soy Broth (TSB) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) enthielt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (INFORS GmbH, Einsbach) bebrütet.

#### 2.1.2 Waschen der Bakterien

Aus der Übernachtskultur wurden am nächsten Morgen 5 ml der Bakteriensuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 4°C und 4.000 Umdrehungen pro Minute (upm) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 5 ml 0,9% NaCl wieder gelöst. Dieser Vorgang wurde 3 Mal wiederholt, um die Bakterien vollständig von bakteriellen Toxinen zu reinigen.

#### 2.1.3 Einstellen der Konzentrationen

In einer Vorarbeit war eine Wachstumskurve für *E. coli* ATCC11229 erstellt worden (Abb. 2). Von der gereinigten *E. coli*-Suspension wurden 100 µl auf 900 µl 0,9% NaCl in ein 1,5 ml Eppendorf Cup gegeben (Verdünnung um 1:10) und die optische Dichte (OD) photometrisch im Ultraspec 3 Photometer (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) bei 600 nm bestimmt. Dieser Wert sollte bei einer Übernachtskultur erfahrungsgemäss bei einer OD von 0,84 liegen. Anschließend wurden 12 µl der ursprünglichen Bakteriensuspension auf 988 µl 0,9% NaCl gegeben und die OD erneut bestimmt. Diese sollte nun bei 0,12 liegen, was laut Wachstumskurve einer Bakterienzahl von  $10^8$  Keimen pro ml entspricht.

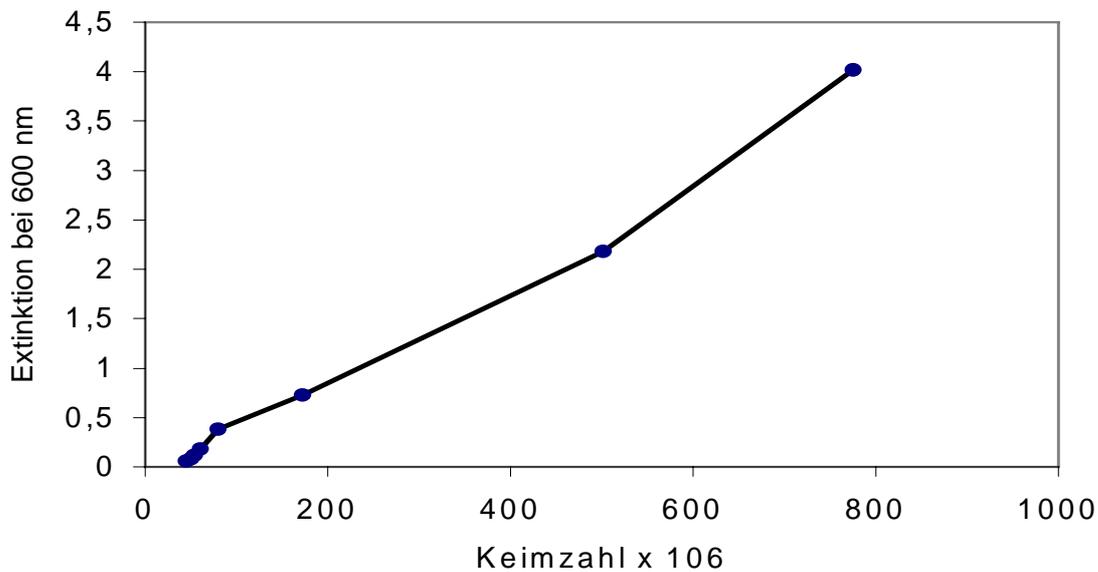


Abb. 2 Wachstumskurve von *E. coli* ATCC11229

Von der Bakteriensuspension der Konzentration  $10^8$  Keimen pro ml wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Bei jedem Schritt wurde jeweils um 1:10 mit 0,9% NaCl verdünnt, bis eine Konzentration von  $10^2$  Keimen pro ml erreicht war. Zur Kontrolle wurden von der Verdünnung  $10^2$  jeweils 100  $\mu$ l auf 2 Blutagarplatten ausplattiert. Nach Bebrütung der Platten über 24 h im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C wurde die Keimzahl bestimmt. (Erwartete Keimzahl: 10 CFU).

#### 2.1.4 Vorversuch zur Ermittlung der Mindestdosis von Cefotaxim zur kompletten Abtötung von $10^6$ *E. coli* pro ml.

Es sollte ermittelt werden, bei welcher Konzentration des Antibiotikums Cefotaxim, ein Cephalosporin der 3. Generation (Claforan®, Aventis, Bridgewater, USA) eine Keimzahl von  $10^6$  *E. coli* pro ml vollständig abgetötet wird. Dazu wurde jeweils 1 ml einer *E. coli*-Suspension der Konzentration von zweimal  $10^6$  Keimen pro ml mit 1 ml einer Antibiotikallösung für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Konzentrationen von Cefotaxim im Ansatz betragen 1  $\mu$ l/ml, 10  $\mu$ l/ml, 100  $\mu$ l/ml, 1 mg/ml und 10 mg/ml. Von jeder Antibiotikakonzentration

wurden 3 Proben hergestellt. Anschließend wurden von jeder Probe zweimal 100 µl auf Blutagar ausplattiert. Nach Bebrütung über 24 h bei 37°C erfolgte eine Kontrolle der Platten auf Keimwachstum.

#### 2.1.5 Vorversuch zur Ermittlung der Mindestdosis von Ciprofloxacin, Imipenem, Gentamicin und Cefotaxim zur vollständigen Abtötung von $10^8$ *E. coli* pro ml

Untersucht werden sollte, welche Konzentrationen von 4 unterschiedlichen Antibiotika nötig sind, um eine Konzentration von  $10^2$ ,  $10^5$  oder  $10^8$  *E. coli* pro ml komplett abzutöten. Verwendet wurden folgende Antibiotika:

1. Ciprofloxacin, ein Gyrasehemmer, (Ciprobay®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) in den Konzentrationen 10 µg/ml, 100µg/ml und 200 µg/ml.
2. Imipenem, ein Carbapenem (Zienam®, MSD GmbH, München, Deutschland) in den Konzentrationen 100 µg/ml, 1 mg/ml und 10 mg/ml.
3. Gentamicin, ein Aminoglycosid (Refobacin®, Merck, Darmstadt, Deutschland) in den Konzentrationen 10 µg/ml, 100 µg/ml und 1 mg/ml.
4. Cefotaxim (Claforan®, Aventis, Bridgewater, USA) in den Konzentrationen 50 µg/ml, 500 µg/ml und 5 g/ml.

Zu 900 µl der Antibiotikasuspension wurden jeweils 100 µl der Bakterien-suspension gegeben und gründlich gevortext, dann für 30 min bei 37°C inkubiert und je zweimal auf Blutagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über 24 h bei 37°C bebrütet und anschließend auf Bakterienwachstum hin kontrolliert.

## 2.2 Überprüfen der DNA – Freisetzung nach dem Abtöten durch Antibiotika

Das Abtöten von Bakterien durch Antibiotika kann zur Zellyse führen. Sobald die DNA frei im Serum vorliegt, könnte sie von anwesenden DNasen zerstört werden, wodurch sie nicht mehr mittels PCR nachzuweisen wäre. Es sollte nun erforscht werden, in wie weit das Abtöten der Bakterien mittels Antibiotika tatsächlich zu einer Freisetzung der DNA führt.

### 2.2.1 Abtöten der Bakterien

Es wurde jeweils 1 ml einer  $10^8$  *E. coli* enthaltenden Suspension mit Cefotaxim, Ciprofloxacin, Imipenem oder Gentamicin bei 0°C inkubiert. Je 1 ml der Bakteriensuspension wurden 100 µl einer Antibiotikallösung zugesetzt, so dass die endgültigen Antibiotikakonzentrationen im Ansatz wie folgt waren:

Cefotaxim: 5 g/l, Ciprofloxacin: 0,2 g/l, Imipenem: 1,5 g/l, Gentamicin: 4 g/l

Parallel wurde je Probe eine Kontrolle hergestellt, die an Stelle des Antibiotikums 100 µl 0,9% NaCl enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden aus jeder Probe 100 µl auf Blutagar ausplattiert, 24 h bei 37°C bebrütet, und anschließend auf Keimwachstum hin untersucht, um die vollständige Abtötung zu überprüfen. Die gesamte Inkubationszeit betrug 2 h.

### 2.2.2 DAPI-Färbung

Nachdem die *E. coli* mit Antibiotika abgetötet worden waren, wurden jeweils 10 µl der Bakteriensuspension (entspricht  $10^6$  Bakterien) auf einen Objektträger getropft. Die Proben wurden bei Raumtemperatur angetrocknet und anschließend zur Hitzefixierung dreimal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen. Um den Tropfen wurde mit einem Silikon-Stift (DAKO-Pen, DAKO, Glostrup, Dänemark) ein Wall aufgetragen. Die Proben wurden einmal mit Phosphate buffered Saline (PBS) gewaschen und lichtgeschützt mit 25 µl 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in der Konzentration 2 mg/ml für 5 min gefärbt. Sie wurden noch 6 mal mit PBS gewaschen, anschließend wurde jeweils 1 Tropfen Fluorescent mounting Medium (DAKO, Glostrup, Dänemark) aufgetragen und die Proben mit einem Deckgläschen abgedeckt.

### 2.2.3 Mikroskopische Auswertung

Die DAPI-gefärbten Proben wurden unter einem Axioplan Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei einer Vergrößerung von 1:1000 ausgewertet. Es wurden sowohl der Phasenkontrastmodus als auch die fluoreszenzmikroskopische Darstellung verwendet. Jeweils 10 zufällig gewählte Gesichtsfelder

wurden in beiden Modi mit Hilfe eines digitalen Systems (KS 300, Kontron Electronic GmbH, Eching, Deutschland) fotografiert. Die folgende Auswertung wurde von zwei verschiedenen Personen durchgeführt. In fluoreszierendem Zustand waren nun nur jene Organismen als leuchtende Punkte sichtbar, welche noch DNA enthielten, da der DAPI Farbstoff an DNA bindet. Im Gegensatz dazu waren im Phasenkontrastmodus alle vorhandenen Organismen sichtbar, auch jene, die ihre DNA während der durch Antibiotika induzierten Zelllyse verloren hatten. Die Anzahl der im Phasenkontrastmodus sichtbaren *E. coli* wurde der Gesamtzahl (100%) an vorhandenen Organismen gleichgesetzt und mit der Anzahl, die im fluoreszierenden Zustand sichtbar war, verglichen.

### **2.3 Einfluss von DNasen auf die Detektierbarkeit von *E. coli*-DNA mittels PCR**

Um durch Antibiotika abgetötete *E. coli* mittels PCR nachzuweisen, muss die DNA erhalten sein. Im Serum vorhandene DNasen können einen Einfluss auf das Schicksal der DNA nach antibiotikainduzierter Zelllyse haben. In den folgenden Versuchen sollte dieser Einfluss quantifiziert werden. Um bei der PCR eine gute Sensitivität zu erreichen, benötigt man eine Menge von 30 pg/0,1ml gereinigter *E. coli* DNA, was einer Keimzahl von  $6 \times 10^5$  pro ml Serum entspricht. Die bei Bakteriämien beobachteten Keimzahlen sind oft wesentlich geringer und können so durch geringere Mengen an DNasen zerstört werden. Deshalb wurde rekombinante humane DNase in bestimmtem Verhältnis zur DNA zugesetzt.

Im Serum liegen unterschiedliche Faktoren wie Natrium oder G-Actin vor, die eine ideale Aktivität der DNase verhindern [24, 28]. Deshalb wurde der Versuch nicht nur in Serum, sondern auch in Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) durchgeführt, in dem durch Zusatz von 10 mmol  $MgCl_2$  und 1 mmol  $CaCl_2$  ein ideales Milieu für die DNase I Aktivität geschaffen war.

### 2.3.1 Versuche mit 30 pg gereinigter *E. coli*-DNA

#### 2.3.1.1 Einfluss der natürlichen Serum-DNasen

Es sollte der Einfluss von den natürlicherweise im Serum vorhandenen DNasen auf die durch Zellyse freigesetzte *E. coli*-DNA getestet werden. Es wurden 40 mal 1 ml humanes Serum mit 30 pg *E. coli*-DNA versetzt. 20 Proben wurden für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, 20 Kontrollen wurden statt dessen auf Eis inkubiert, um die Aktivität der DNase zu unterdrücken. Anschließend wurden alle Proben zur Ausfällung der Serumproteine für 10 min auf 94°C erhitzt und für 5 min bei 14000 upm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 µl in die PCR eingesetzt.

#### 2.3.1.2 Rekombinante humane DNase I in Serum

Es sollte festgestellt werden, in welchem Gewichtsverhältnis DNA : DNase I vorliegen muss, bis die *E. coli*-DNA soweit zerstört wird, dass sie nicht mehr durch PCR nachweisbar ist. Zu 70 µl humanem Serum einer gesunden Person wurden jeweils 30 pg gereinigte *E. coli*-DNA und 30 µl einer DNase-Verdünnung aus rekombinanter humaner DNase (rhDNase, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) in ein 1,5 ml Eppendorf Cup gegeben. Die rhDNase I hatte ursprünglich eine Konzentration von 1 µg/µl und wurde mit Tris-HCl-Puffer so verdünnt, dass die Konzentration in 30 µl dann 30 ng bzw. 30 µg betrug. Das entspricht einem Verhältnis von DNA : rhDNase I von 1:10<sup>3</sup> (30 ng DNase I) bzw. 1:10<sup>6</sup> (30 µg DNase I).

Hergestellt wurden 10 Proben und 10 Kontrollen mit 30 µl Tris-HCl-Puffer an Stelle der DNase. Alle Proben wurden für 2 h bei 37°C inkubiert, anschließend für 10 min auf 94°C erhitzt und für 5 min bei 14000 upm zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 10 µl in die PCR eingesetzt.

### 2.3.1.3 Rekombinante humane DNase I in Tris-HCl-Puffer

Es wurden 10 mal jeweils 70 µl Tris-HCl-Puffer, der wie unter 2.3 beschrieben für eine bessere Aktivität der rhDNase I mit MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> versetzt worden war, in ein 1,5 ml Eppendorf Cup gegeben. Hinzu kamen 30 pg gereinigte *E. coli*-DNA und 30 µl einer rhDNase-Verdünnung. Die rhDNase I wurde soweit mit Tris-HCl-Puffer verdünnt, dass sich folgende Verhältnisse von DNA : DNase I ergaben: 1:10<sup>-1</sup> (3 pg DNase I), 1:1 (30 pg DNase I), 1:10 (300 pg DNase I), 1:10<sup>2</sup> (3 ng DNase I) oder 1:10<sup>4</sup> (300 ng DNase I).

Je Probe wurde eine Kontrolle hergestellt, die anstelle der rhDNase I Tris-HCl-Puffer enthielt. Proben und Kontrollen wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. Aus dem 100 µl Ansatz wurden jeweils 10 µl in die PCR eingesetzt.

### 2.3.2 Einfluss von DNasen auf die Detektion von abgetöteten *E. coli* mittels PCR

#### 2.3.2.1 In Serum und Tris-HCl-Puffer

Da in den Bakterien Faktoren vorliegen könnten, wie beispielsweise Histonen-ähnlichen-Proteine [34], welche die DNA vor der Zerstörung durch DNasen schützen auch wenn die Zelle durch Antibiotika abgetötet und lysiert wurde, wurden nun vollständige, abgetötete Bakterien mit rhDNase in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt. Aus einer Übernachtskultur wurde wie unter 1.3 beschrieben die *E. coli*-Konzentration von 10<sup>3</sup>/ml hergestellt und für 15 min mit Cefotaxim (1 mg/ml) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Suspension auf Blutagarplatten ausplattiert und 24 h bei 37°C bebrütet, um die vollständige Abtötung durch das Antibiotikum zu kontrollieren. Die Proben wurden jeweils mit Tris-HCl-Puffer oder Serum im Verhältnis 1:100 verdünnt, die Endkonzentration betrug 10<sup>1</sup> *E. coli* pro ml. Das Serum entstammte einer gesunden Person und war vorher zweimal für 10 min bei 2000 upm abzentrifugiert worden. Es wurden 80 Proben in Tris-HCl-Puffer und 120 Proben in Serum hergestellt. Anschließend wurden die Proben mit 50 µl rhDNase I-Lösung im Verhältnis DNA : DNase 1 : 10<sup>6</sup> oder 1 : 10<sup>9</sup> versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert.

Es wurden also bei  $10^1$  *E. coli* 50 ng bzw. 50 µg rhDNase I zugegeben. Je Probe wurde eine Kontrolle hergestellt, bei der anstelle der rhDNase-Lösung 0,9% NaCl zugegeben wurde. Das Endvolumen der Proben betrug 1,05 ml. Anschließend wurde eine DNA-Isolierung durchgeführt.

## 2.4 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde mit dem Puregene DNA Isolation Kit (Biozym GmbH, Oldendorf, Deutschland) nach dem Protokoll für 100 bis 10.000 Zellen folgendermaßen durchgeführt:

Die Proben wurden bei 16000xg für ca. 5 s zentrifugiert, damit sich die *E. coli*-Bakterien als Pellet absetzen konnten. Der Überstand wurde bis auf 2-5 µl abpipettiert und verworfen. Die Proben wurden kurz gevortext, um das Bakterienpellet wieder zu lösen. Anschließend wurden sie mit 60 µl Cell Lysis Solution versetzt, einige Male auf und ab pipettiert und für 5 min bei 80°C im Heizblock (DRI-Block DB 2A, Techne, Cambridge, England) inkubiert, um die Bakterien vollständig zu lysieren und so die bakterielle DNA frei zu setzen. Sobald die Proben wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden ihnen 20 µl Protein Precipitation Solution zugegeben, durch gründliches Vortexen wurden störende Proteine ausgefällt, anschließend wurde die Probe bei 16000xg für 3 min zentrifugiert. Der die DNA enthaltende Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Cup überführt, welches 60 µl 100% Isopropanol (2-Propanol, Merck, Darmstadt, Deutschland) enthielt. Durch 50maliges Wenden wurde die DNA gefällt, so dass sie sich nach Zentrifugation über 1 min bei 16000xg als festes Pellet absetzte. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 60 µl 70% Ethanol (Merck) gewaschen, um letzte Verunreinigungen zu entfernen und erneut 1 min bei 16000xg abzentrifugiert, das Ethanol wurde abpipettiert und verworfen. Anschließend wurden die Proben für ca. 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Abschluss wurden 30 µl DNA Hydration Solution zugegeben und die Proben bei 65°C im Heizblock inkubiert, damit die DNA vollständig rehydriert werden konnte. Die DNA war nun bereit, in die PCR

eingesetzt zu werden. In Serum wurde, wegen des hohen Proteingehalts, statt der 20 µl Protein Precipitation Solution eine größere Menge, nämlich 50 µl verwendet.

## 2.5 PCR

Für die PCR wurden zwei Primer-Paare verwendet, das eine so verschachtelt (nested) in das andere, dass bei der zweiten Amplifizierung, der nested PCR, ein Abschnitt des Amplifikats der ersten PCR amplifiziert wird. Der amplifizierte Abschnitt der 1. PCR ist 486 Basenpaare lang und abgeleitet von dem *uidA* Gen von *E. coli*, welches für die β-Glucuronidase kodiert. Die Primer waren folgendermaßen zusammengesetzt:

1.PCR: P<sub>1</sub>: 5`-ATC ACC GTG GTG ACG CAT GTC GC-3`  
P<sub>2</sub>: 5`-CAC CAC GAT GCC ATG TTC ATC TGC-3`

Nested PCR: P<sub>3</sub>: 5`-TAT GAA CTG TGC GTC ACA GCC-3`  
P<sub>4</sub>: 5`-CAT CAG CAC GTT ATC GAA TCC-3`

Die Reaktionen wurden in einem 50 µl-Mastermix durchgeführt, der sich wie in Tabelle 1 und 2 dargestellt zusammensetzte:

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermix, 1. PCR.

Reagens	Konzentration	Menge je 50µl-Ansatz	Endkonzentration
10 x Puffer	Tris-HCl: 100 mM KCl: 500 mM MgCl <sub>2</sub> : 15 mM	5 µl	Tris-HCl: 10 mM KCl: 50 mM MgCl <sub>2</sub> : s.u.
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	6 µl	3,0 mM + 1,5 mM (10xP) = 4,5 mM
dNTP	Je 10 mM	3 µl	Je 600 µM
Primer 1	10 µM	3 µl	0,6 µM
Primer 2	10 µM	3 µl	0,6 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5.000 u/ml	0,4 µl	1 Unit

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mastermix, nested PCR.

Reagens	Konzentration	Menge je 50µl-Ansatz	Endkonzentration
10x Puffer	Tris-HCl: 100 mM KCl: 500 mM MgCl <sub>2</sub> : 15 mM	5 µl	Tris-HCl: 10 mM KCl: 50 mM MgCl <sub>2</sub> : s.u.
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5µl	2,5 mM + 1,5 mM (10xP) = 4,0 mM
dNTP	Je 10 mM	4 µl	Je 800 µM
Primer 3	10 µM	2 µl	0,4 µM
Primer 4	10 µM	2 µl	0,4 µM
<i>Q-Solution</i>	5 x konzentriert	10 µl	1 x konzentriert
<i>Taq</i> -Polymerase	5.000 u/ml	0,4 µl	1 Unit

Bei jedem PCR-Durchlauf wurden von beiden Mastermix Reagenzienkontrollen mitgeführt, um eine Verunreinigung der Reagenzien mit *E. coli*-DNA auszu-

schließen. Außerdem gab es eine Positivkontrolle, die 30 pg gereinigte *E. coli*-DNA enthielt, um die Funktion der PCR zu überprüfen.

Die isolierte und rehydrierte DNA (29,6 µl) wurde nun zu 20,4 µl des 1. Mastermix in ein 0,6 ml Eppendorf Cup zugegeben und gevortext, um sie gut mit den PCR-Reagenzien zu mischen. Die Probe wurde mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten zu verhindern, und in den Termocycler (Hybaid Omni Gene, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) eingesetzt. Weil die native *Taq*-DNA-Polymerase ihre Aktivität schon bei geringen Temperaturen entfaltet, wobei es zu unspezifischen, unerwünschten Reaktionen kommen kann, wurde ein sog. „Hotstart“ durchgeführt, das bedeutet, dass alle Proben erst in den Termocycler eingesetzt wurden, wenn dieser die Denaturierungstemperatur von 95°C erreicht hatte.

Tabelle 3: Programm, 1. PCR:

Initialdenaturierung:	5 min bei 95°C	
Denaturierung:	30 s bei 95°C	35 Zyklen
Annealing:	1 min bei 65°C	35 Zyklen
Extension:	1 min bei 72°C	35 Zyklen

Anschließend wurden 2 µl des amplifizierten Produkts (ein 486-bp- Fragment) zu 48 µl des Mastermix für die nested PCR gegeben, gevortext, mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet und wieder in den vorgeheizten Termocycler eingesetzt.

Tabelle 4: Programm, nested PCR:

Initialdenaturierung:	5 min bei 95°C	
Denaturierung:	30 s bei 95°C	35 Zyklen
Annealing:	1 min bei 50°C	35 Zyklen
Extension:	1 min bei 72°C	35 Zyklen
Terminale Extension:	5 min bei 72°C	

10 µl des amplifizierten Produkts der nested PCR wurden mit 2 µl Gel-loading-buffer (0,25 g Bromphenol Blau und 40 g Saccharose, gelöst in 100 ml destilliertem Wasser) vermischt auf ein 2% Agarose Gel aufgetragen (Agarose, Eurobio Les Ulis Cedex, France) und bei 110 V für 40 min in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 15 min in einer Ethidium-Bromid-Lösung der Konzentration 0,5 µg / ml gefärbt, unter UV-Licht auf die Anwesenheit der erwarteten 186-bp-Bande angeschaut und zur Dokumentation fotografiert.

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Versuche wurde mit Fisher's exact test mit dem SAS software System, Version 6.12 (SAS, Cary, USA) durchgeführt. Ein signifikantes Ergebnis wurde ab einem p-Wert von  $< 0,05$  angenommen [2].

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuch zur Ermittlung der Mindestdosis von Cefotaxim zur kompletten Abtötung von $10^6$ *E. coli* pro ml.

Für die Versuche war eine vollständige Abtötung der Bakterien Voraussetzung. Deshalb wurde die Abtötung von  $10^6$  *E. coli* pro ml mit Cefotaxim in steigender Konzentration getestet. Tabelle 5 zeigt das Ergebnis nach Bebrütung der Kontrollplatten über 24 h.

Tabelle 5: Bakterienwachstum nach Cefotaximgabe

Cefotaximkonzentration	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml
Platte 1	++	++	+	--	--
Platte 2	++	+	--	--	--
Platte 3	++	++	+	--	--
Platte 4	++	++	+	--	--
Platte 5	+	+	+	--	--
Platte 6	++	++	--	--	--

++ = ausgeprägtes Bakterienwachstum; + = 1 – 12 CFU gewachsen;  
-- = kein Bakterienwachstum

Es zeigte sich, dass die nötige Dosierung von Cefotaxim zur vollständigen Abtötung von  $10^6$  Bakterien mindestens 1 mg/ml beträgt.

#### 3.2 Vorversuch zur Ermittlung der Mindestdosis von Ciprofloxacin, Imipenem, Gentamicin und Cefotaxim zur kompletten Abtötung von $10^8$ *E. coli* pro ml

Für den Versuch 1.2 (Freisetzung von DNA nach Antibiotikagabe) wurde ermittelt, welche Konzentrationen von Gentamicin, Ciprofloxacin, Imipenem oder Cefotaxim nötig sind, um *E. coli*-Konzentrationen von  $10^2$ ,  $10^5$  oder  $10^8$  pro ml

sicher abzutöten. Die im endgültigen Versuch verwendete Konzentration betrug  $10^8$  Bakterien pro ml.

In Tabelle 6 ist das Bakterienwachstum nach 24 h Bebrütungszeit dargestellt.

Tabelle 6: Wachstum von *E. coli* nach Gabe von Gentamicin, Ciprofloxacin, Imipenem oder Cefotaxim

Bakterienkonzentration pro ml	$10^2$		$10^5$		$10^8$	
	Platte1	Platte2	Platte1	Platte2	Platte1	Platte2
Gentamicin 10 µg/ml	++	++	++	++	+++	+++
100 µg/ml	+	+	+	+	++	++
1 mg/ml	--	--	--	--	+	+
Ciprofloxacin 10 µg/ml	--	(+)	--	--	+	(+)
100 µg/ml	--	--	--	--	--	--
200 µg/ml	--	--	--	--	--	--
Imipenem 100 µg/ml	+	+	+	+	+	+
1mg/ml	--	--	--	--	--	--
10 mg/ml	--	--	--	--	--	--
Cefotaxim 50 µl/ml	--	--	--	--	+	+
5 mg/ml	--	--	--	--	--	--
50 mg/ml	--	--	--	--	--	--

+++ = sehr dichtes Wachstum; ++ = deutliches Wachstum;  
+ = geringes Wachstum; (+) = 1-2 CFU; -- = kein Wachstum.

Aus Tabelle 6 geht hervor, dass bei Gentamicin die Konzentration von 1 mg/ml zwar ausreicht, eine Bakterienkonzentration von  $10^2$  oder  $10^5$  *E. coli* pro ml abzutöten, nicht aber  $10^8$  *E. coli* pro ml. Daher wurde im folgenden Versuch zur Beurteilung der Freisetzung von DNA eine höhere Konzentration (4 g/l) ver-

wendet, durch die dann eine vollständige Abtötung der  $10^8$  Keime erreicht wurde, wie durch Ausplattieren von 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension auf Blutagarplatten und Bebrütung über 24 h nachgewiesen wurde. Bei den übrigen Antibiotika wurde die vollständige Abtötung der  $10^8$  Keime bereits bei der zweiten Konzentrationsstufe erreicht.

### **3.3 Beurteilung der DNA-Freisetzung aus *E. coli* nach dem Abtöten durch Antibiotika**

Getestet wurde die Freisetzung bakterieller DNA nach kompletter Abtötung der Organismen durch bakterizide Dosen vier unterschiedlicher Antibiotika. Die bakterielle DNA wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI angefärbt. Im Vergleich von Fluoreszenzmikroskopie und Phasenkontrastmikroskopie konnte durch die Antibiotika eine Verminderung der gefärbten, also DNA-haltigen, Bakterien gegenüber den im Phasenkontrast sichtbaren Bakterien (100%) gezeigt werden.

Abb. 3 zeigt drei Ausschnitte, jeweils im Fluoreszenz- und im Phasenkontrastmodus.

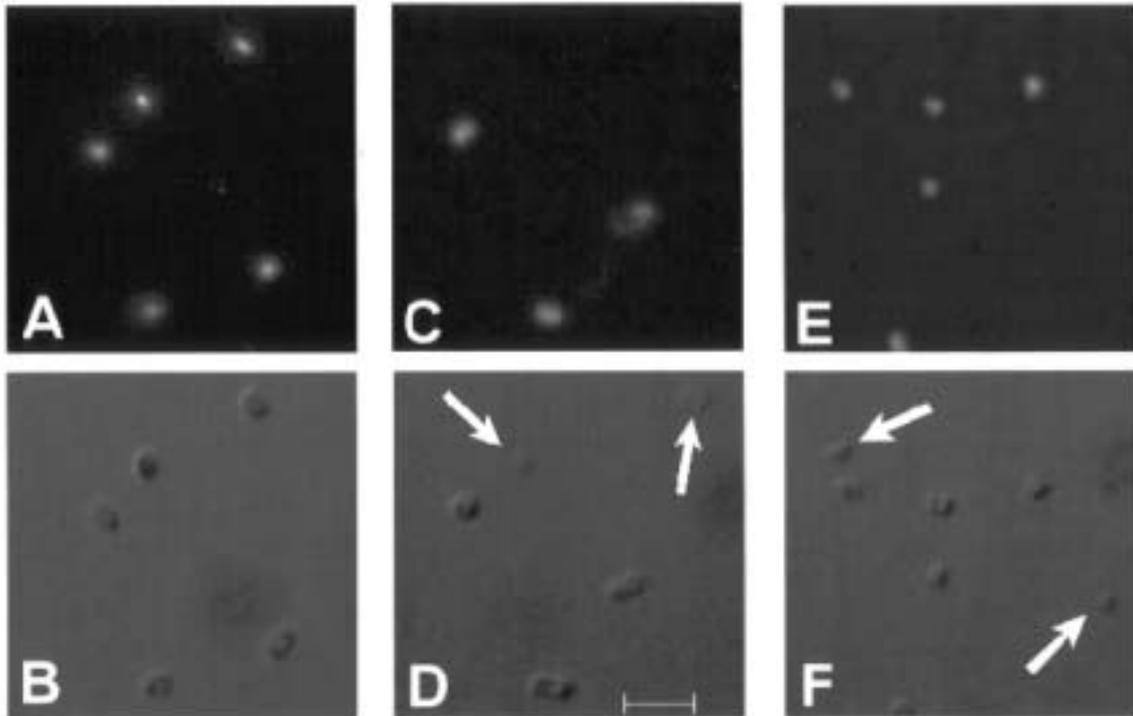


Abb. 3: DNA-Freisetzung aus *E. coli* nach Abtötung durch Antibiotika. Die Bakterien wurde mit Puffer (A, B), Cefotaxim (C, D) oder Imipenem (E, F) inkubiert. Oben (A, C, E) die Darstellung im Fluoreszenzmodus. Es sind nur die mittels DAPI angefärbten, DNA-haltigen Bakterien sichtbar. Unten (B, D, F) im Phasenkontrastmodus sind sowohl DNA-haltige als auch DNA-entleerte *E. coli* sichtbar. Die Pfeile markieren die nur im Phasenkontrast erkennbaren Organismen, die keine DNA mehr enthalten. Vergrößerung x 1000. Die Markierung entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Das Ergebnis der Auszählung jeweils 10 zufällig gewählter Gesichtsfelder ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Mittelwerte der Bakterienzahlen je Gesichtsfeld ( $\pm$  Standardabweichung)

	Cefotaxim	Ciprofloxacin	Imipenem	Gentamicin	Kontrollen
Phasenkontrastmodus	38,9 (11,2)	58,3 (33,1)	42,6 (28,2)	36,4 (19,1)	44,7 (30,7)
Fluoreszenzmodus	28,0 (14,6)	46,8 (29,8)	35,1 (22,1)	30,8 (16,0)	42,3 (29,2)

In Abb. 4 wird der prozentuale Anteil noch DNA-haltiger, im Fluoreszenzmodus sichtbarer Bakterien an der Gesamtzahl der im Phasenkontrast sichtbaren Organismen (100%) dargestellt:

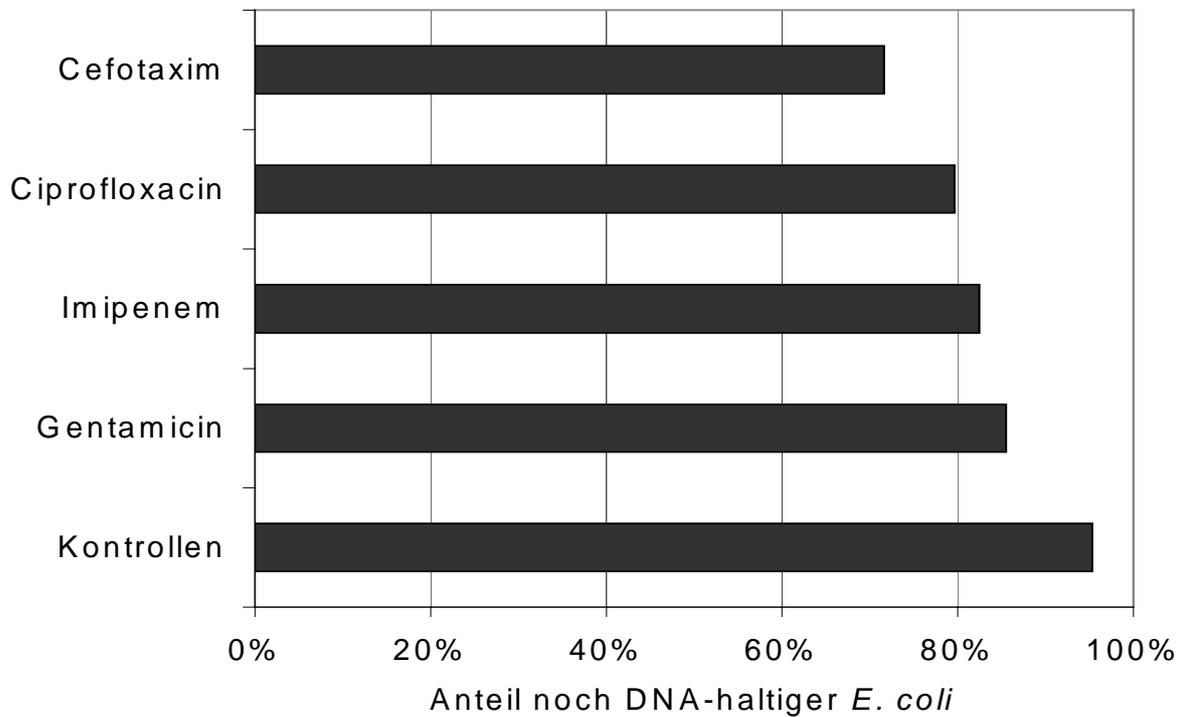


Abb. 4: Anteil der DNA-enthaltenden *E. coli* nach deren Abtötung durch Antibiotika

Tabelle 8 zeigt die Verminderung der DNA enthaltenden, DAPI positiven Bakterien und den DNA-Verlust je 10 *E. coli*, wenn man von einem mittleren DNA-Gehalt von 5 fg pro *E. coli* ausgeht.

Tabelle 8: Mittelwerte der in 10 Gesichtsfeldern gezählten Bakterienzahlen ( $\pm$  Standardabweichung) im Phasenkontrast- und Fluoreszenzmodus, deren Differenz in %, und der daraus berechnete DNA-Verlust bezogen auf 10 *E. coli* in fg.

Behandlung	Mittelwerte der Bakterienzahlen ( $\pm$ Standardabweichung)			DNA-Verlust in fg/10 <i>E. coli</i>
	Phasenkontrast	Fluoreszenzmodus	Differenz in %	
Kontrollen	44,7 (30,7)	42,3 (29,2)	4,7 (4,1)	2,3
Cefotaxim	38,9 (11,2)	28,0 (14,6)	28,4 (9,1)	14,2
Ciprofloxacin	58,3 (33,1)	46,8 (29,8)	20,4 (7,1)	10,2
Imipenem	42,6 (28,2)	35,1 (22,1)	17,6 (3,3)	8,8
Gentamicin	36,4 (19,1)	30,8 (16,0)	14,8 (9,5)	7,4

In den unbehandelten Kontrollen lag die mittlere Verminderung der DAPI-positiven Bakterien und damit der DNA-Verlust bei 4,7%. Er war damit signifikant geringer ( $p < 0,05$ ) als bei den mit Antibiotika behandelten Bakterien.

Es wird deutlich, dass die verschiedenen Antibiotika zu einer unterschiedlich ausgeprägten Freisetzung der DNA aus *E. coli* führen. Der größte Teil (zwischen 71,5% und 85,5%) der DNA verbleibt jedoch bei allen verwendeten Antibiotika innerhalb der Bakterienhülle.

### 3.4 Der Einfluss der Aktivität von DNasen auf die Nachweisbarkeit von *E. coli* mittels PCR

#### 3.4.1 Gereinigte *E. coli*-DNA mit natürlichen Serum-DNasen

Die natürlicherweise im Serum enthaltenen DNasen hatten keinerlei Einfluss auf die Nachweisbarkeit von 30 pg gereinigter *E. coli*-DNA. Sowohl in den Proben, als auch in den statt dessen auf Eis inkubierten Kontrollen zeigten 18 von 20 Proben ein positives Ergebnis in der PCR.

### 3.4.2 Inkubation gereinigter *E. coli*-DNA mit rekombinanter humaner DNase I in humanem Serum

Ermittelt wurde die Gewichtsrelation von DNA zu rhDNase I in Serum, die den Nachweis von 30 pg gereinigter *E. coli*-DNA mittels PCR signifikant einschränkt. Das Ergebnis zeigt eine signifikante Abnahme der Nachweisbarkeit der DNA bei einem Gewichtsverhältnis von DNA zu DNase I von  $1:10^6$  (siehe Abb. 5)

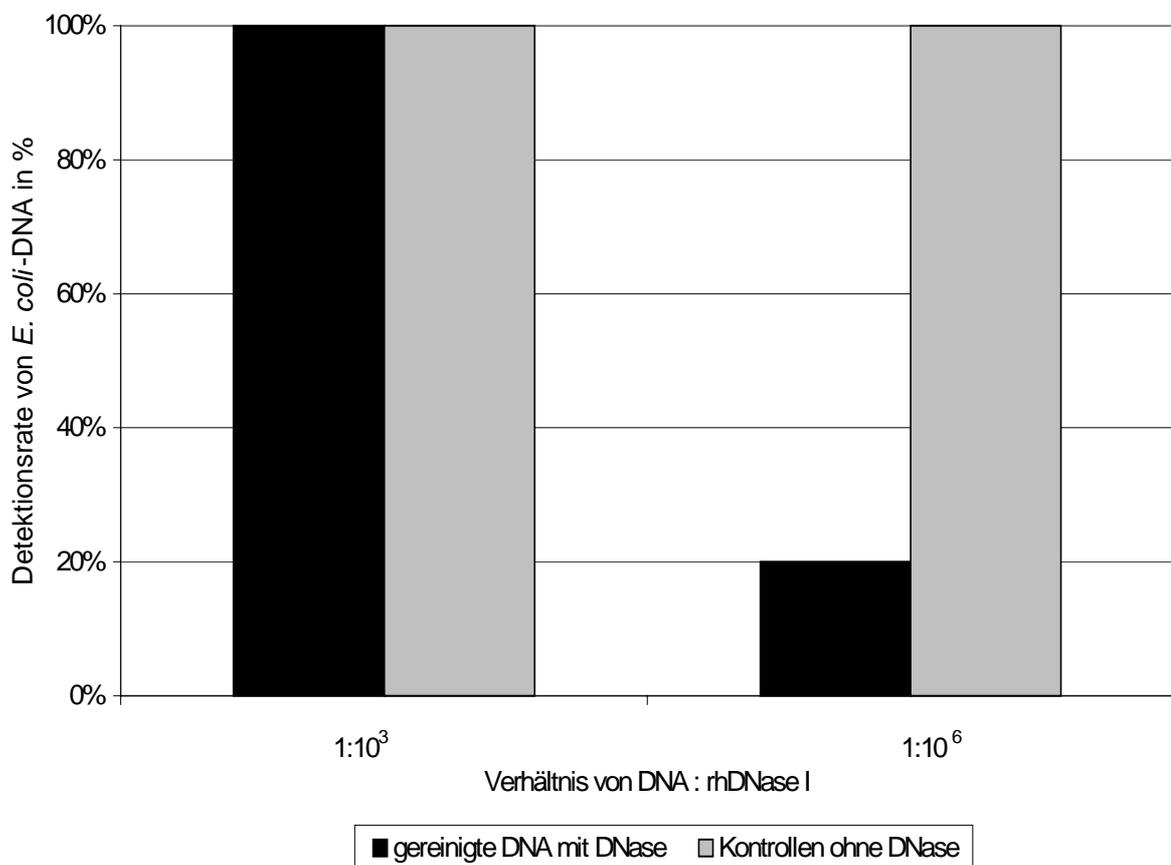


Abb. 5: Detektionsrate von 30 pg gereinigter *E. coli*-DNA, die in humanem Serum mit DNase I in einem Gewichtsverhältnis von  $1:10^3$  bzw.  $1:10^6$  versetzt wurde, und den unbehandelten Kontrollen mittels PCR in %

### 3.4.3 Inkubation gereinigter *E. coli*-DNA mit rekombinanter humaner DNase I in Tris-HCl-Puffer

Um das Vorliegen von Faktoren im Serum, die die Aktivität der DNase I reduzieren, auszuschließen, wurde der Versuch in Tris-HCl-Puffer wiederholt, der eine optimale Zusammensetzung für die DNase I Aktivität bietet. Getestet wurden fünf unterschiedliche Gewichtsrelationen von DNA zu rhDNase I ( $1:10^{-1}$ ;  $1:10^0$ ;  $1:10^1$ ;  $1:10^2$  und  $1:10^4$ )

Abb. 6 zeigt beispielhaft die Ergebnisse von 7 Proben mit einem Verhältnis von DNA : rhDNase von  $1:10^{-1}$ , und den entsprechenden Kontrollen, die an Stelle von rhDNase mit Tris-HCl-Puffer inkubiert worden waren.

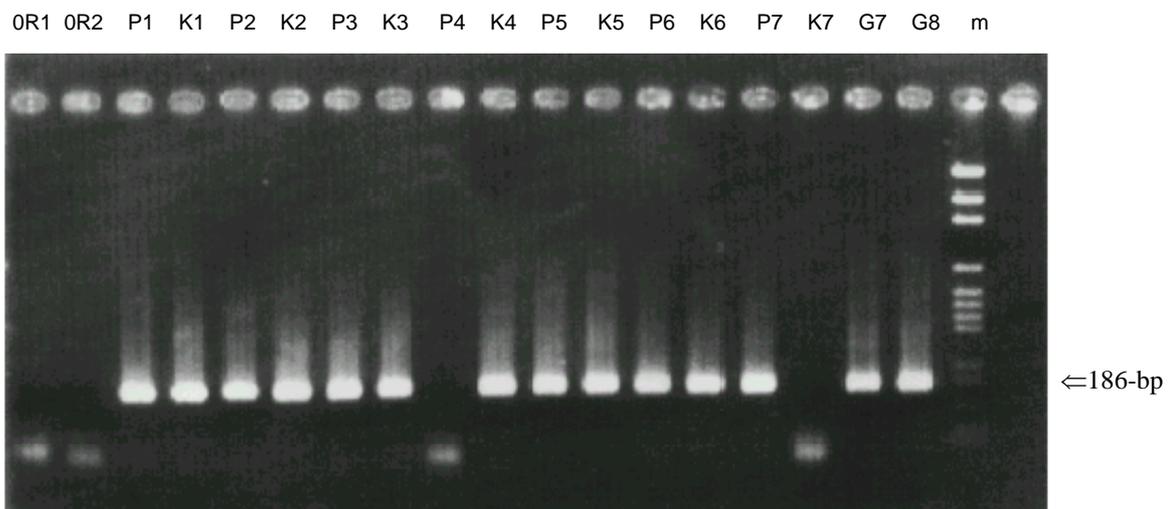


Abb. 6: Gel von sieben mit rhDNase versetzten Proben (P) gereinigter *E. coli* DNA, Verhältnis DNA : DNase I  $1:10^{-1}$  (30 pg DNA, 3 pg DNase I), und den sieben entsprechende Kontrollen (K) in Tris-HCl-Puffer. P4 und K7 sind negativ, die erwartete 186-bp-Bande ist nicht zu erkennen. Die restlichen Proben und Kontrollen sind positiv. OR1 und OR2 sind Reagenzien-Leerwerte der PCR (negativ), G7 und G8 die Positivkontrolle (1 pg bzw. 100 fg DNA), m ist der Marker zur Identifizierung der erwarteten 186-bp-Bande.

In Abb. 7 zeigt sich eine signifikante Abnahme der Nachweisbarkeit der *E. coli*-DNA mittels PCR bei einem Gewichtsverhältnis von DNA zu rhDNase I von  $1:10^4$  (entspricht 300 ng DNase I), also bei einer geringeren Konzentration der DNase I als in humanem Serum.

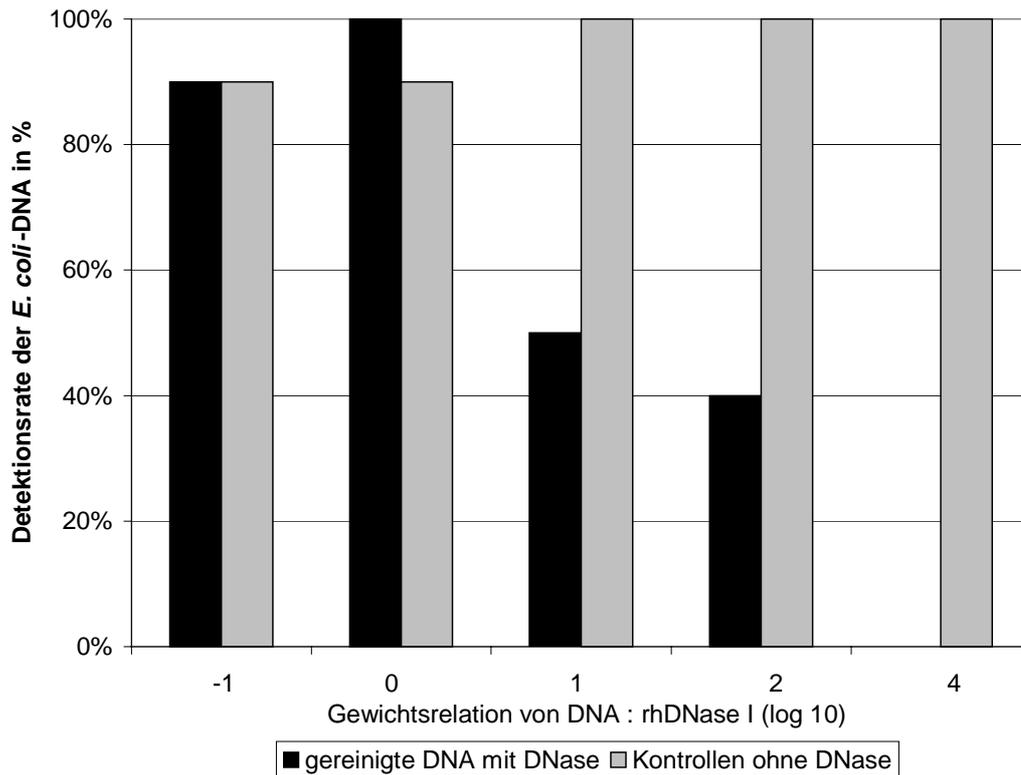


Abb. 7: Detektionsrate von gereinigter *E. coli*-DNA, die in einem Gewichtsverhältnis von  $1:10^{-1}$ ,  $1:10$ ,  $1:10^1$ ,  $1:10^2$  und  $1:10^4$  in Tris-HCl-Puffer mit DNase I versetzt wurde mittels PCR in %

Wenn man die Ergebnisse des ersten Versuches in Serum und die des zweiten Versuches in Tris-HCl-Puffer in einem direkten Vergleich gegenüberstellt, ergibt sich folgendes Bild (Abb. 8):

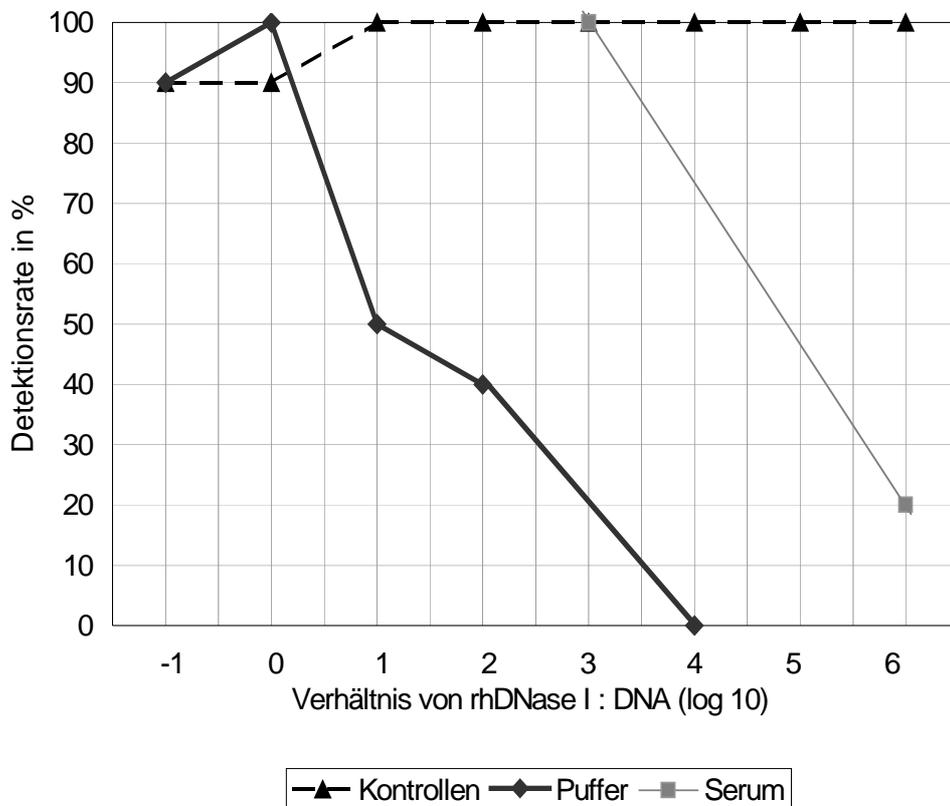


Abb. 8.: Die Detektionsraten von 30 pg gereinigter *E. coli*-DNA, die mit DNase I in steigender Konzentration inkubiert wurde, in Serum bzw. Tris-HCl-Puffer im Vergleich mittels PCR in %

Hier wird deutlich, dass im Serum eine wesentlich höhere Menge an DNase I nötig ist, um die PCR negativ zu beeinflussen.

### 3.4.4 Inkubation von durch Antibiotika abgetöteten *E. coli* mit rekombinanter humaner DNase I in humanem Serum

Untersucht wurde, ob größere Mengen an humaner, rekombinanter DNase I die Detektionsrate von *E. coli*, die zuvor durch bakterizide Mengen Cefotaxim abgetötet worden waren, senken können. Abb. 9 zeigt keine signifikante Verringerung der Detektionsrate von den mit rhDNase I inkubierten Proben gegenüber den Kontrollen.

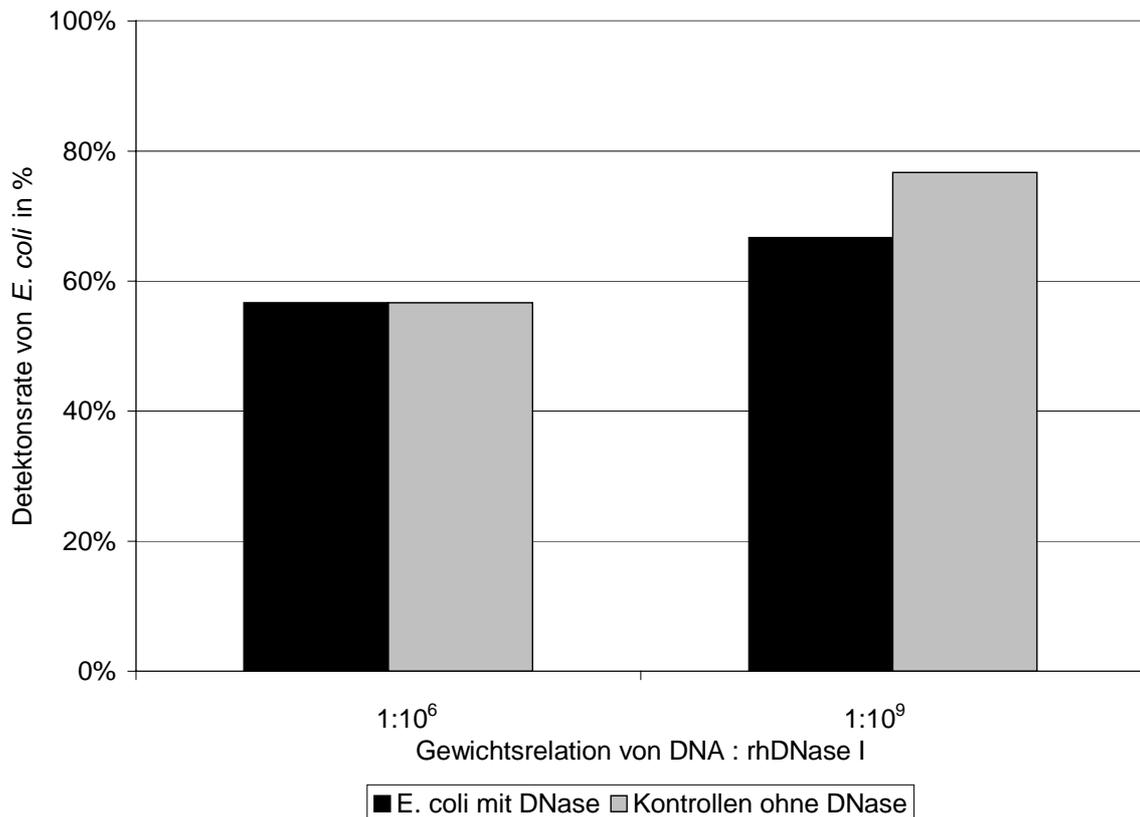


Abb. 9: Detektionsrate von mit DNase I in einem Gewichtsverhältnis von 1:10<sup>6</sup> bzw. 1:10<sup>9</sup> inkubierten abgetöteten *E. coli* in Serum mittels PCR in %

### 3.4.5 Inkubation von durch Antibiotika abgetöteten *E. coli* mit rekombinanter humaner DNase I in Tris-HCl-Puffer

Auch als der Versuch in Tris-HCl-Puffer wiederholt wurde, in dem die Aktivität der DNase I  $>10^2$  mal höher ist als in Serum, zeigten die mit humaner, rekombinanter DNase I versetzten Proben gegenüber den Kontrollen keine signifikant verringerte Detektionsrate in der PCR (Siehe Abb. 10).

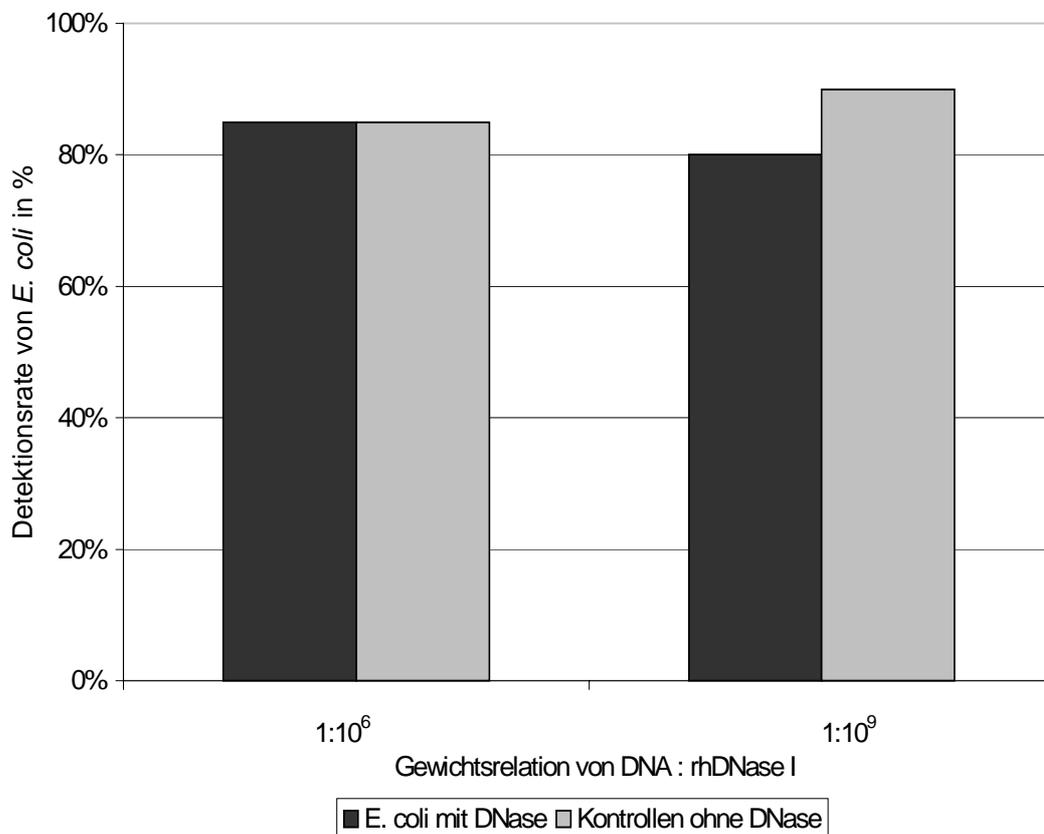


Abb. 10: Detektionsrate von mit DNase I in einem Gewichtsverhältnis von 1:10<sup>6</sup> bzw. 1:10<sup>9</sup> versetzten, abgetöteten *E. coli* in Tris-HCl-Puffer mittels PCR in %

### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Abschließend kann festgestellt werden, dass die humane DNase I in der Lage ist die Detektionsrate freier *E. coli* DNA erst ab einer Gewichtsrelation von 1:10<sup>6</sup>, bzw. die Detektionsrate der DNA von durch Cefotaxim abgetöteten *E. coli* mittels PCR nicht einmal bei einer Gewichtsrelation von 1:10<sup>9</sup> signifikant zu verringern. Im Zusammenhang mit dem Ergebnis, dass nach dem Abtöten der *E. coli* durch Antibiotika unterschiedlicher Wirkungsweise nur etwa 15 – 28% der DNA freigesetzt wird und somit durch die humane DNase I abgebaut werden kann, ergibt dies eine Verringerung der Detektierbarkeit von 10 *E. coli* /ml nach Antibiotikagabe um maximal 20%.

## 4 Diskussion

Im Hintergrund der Arbeit stand die Tatsache, dass die Blutkultur als der Goldstandard für den Nachweis von Bakteriämien gilt [32, 41]. Die Ergebnisse dieses diagnostischen Verfahrens sind jedoch nicht zufriedenstellend, ganz besonders bei Patienten unter Antibiotikatherapie. Darby et al. [6] haben in einer Studie mit Intensivpatienten, in der ca. 65% der Patienten bei Entnahme der Kultur antibiotisch vorbehandelt waren, gezeigt, dass bei diesen Patienten der Anteil an positiven Blutkulturen deutlich geringer ist (2,2%) als bei den unbehandelten Patienten (6,4%). Man muss also davon ausgehen, dass man mittels Blutkultur einen wesentlichen Anteil an falsch-negativen Ergebnissen erhält. Die Ursache hierfür liegt darin, dass die Bakterien im Blut nach Antibiotikagabe oft nicht mehr vermehrungsfähig sind und somit nicht durch kulturelle Verfahren nachgewiesen werden können. Hingegen können sich am Infektionsfokus durchaus noch lebende Organismen befinden und weiterhin streuen. Außerdem beschreiben Sparwasser et al. [30, 31], dass auch abgetötete Bakterien, bzw. deren freigesetzte DNA eine immunstimulierende Wirkung zeigt und zu einer Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen führen kann.

Die PCR konnte für den Fall, dass im Blut durch vorausgegangene Antibiotikagabe keine vermehrungsfähigen Bakterien mehr vorhanden sind, bereits Vorteile gegenüber der Blutkultur aufweisen. So fanden Heininger et al. [11] in einem Rattenmodell mit künstlich provozierte *E. coli*-Bakteriämie nach Gabe des Antibiotikums Cefotaxim in der PCR eine um 80% höhere Detektionsrate im Vergleich zur Blutkultur. Bereits 15 Minuten nach Antibiotikagabe waren die Keime mittels Kulturverfahren kaum mehr nachweisbar, die PCR war jedoch noch in 100% der Proben positiv! Selbst 45 Minuten nach Antibiotikagabe konnte die PCR noch in über 50% den Keim sicher nachweisen. Ohne Antibiotikagabe wurde in diesem Rattenmodell eine ähnliche Sensitivität von PCR und Blutkulturen ermittelt. Auch Zhang et al. [43] fanden bei der Detektion von *Streptococcus pneumoniae* aus Vollblut mittels PCR im Vergleich zum Kultur-

verfahren eine höhere Sensitivität der PCR in den Fällen, in denen die Patienten antibiotisch vorbehandelt waren.

Das Interesse galt bei dieser Arbeit in erster Linie dem Verbleib der bakteriellen DNA, nachdem die Bakterien durch Antibiotika abgetötet worden waren. Die Überlegung war, welche Faktoren die PCR als Nachweismethode beeinflussen und den Nachweis mittels PCR limitieren könnten.

Einer dieser Faktoren könnte die im Blut vorhandene DNase sein, ein DNA-spaltendes Enzym, das eventuell in der Lage ist, bakterielle DNA so weit abzubauen, dass diese nicht mehr mittels PCR nachzuweisen ist [24]. Da nur freigesetzte, nicht mehr in der Bakterienhülle geschützte DNA durch Enzyme abgebaut werden kann, befasste sich ein Teil der Arbeit mit der Frage, welcher Prozentsatz der DNA nach dem Abtöten der Bakterien durch Antibiotika freigesetzt und so der Aktivität der DNase ausgesetzt wird. Dieser war besonders interessant, weil, wie oben erwähnt, Sparwasser et. al beschrieben hatten, dass allein die freigesetzte, bakterielle DNA zu einer Aktivierung des Immunsystems und schließlich zu einem toxischen Schock führen kann [30, 31]. In seiner Studie injizierte er Mäusen bakterielle DNA ( $10^{-1}$ - $10^2$  µg/ml). Eine deutliche Reaktion des Immunsystems war ab einer DNA-Konzentration von  $10^1$  µg/ml festzustellen. Wenn man von einem mittleren DNA-Gehalt von 5 fg/*E. coli* ausgeht, entspricht diese Menge der DNA von  $2 \times 10^3$  *E. coli*/ml. Da jedoch, wie wir zeigen konnte, nur 15-28% der bakteriellen DNA nach der Abtötung durch Antibiotika freigesetzt wird, wäre eine Bakterienlast von über  $10^4$  *E. coli*/ml nötig, um zu einer deutlichen Reaktion des Immunsystems zu führen und diese wird bei Bakteriämien im klinischen Alltag selbst bei Kindern nicht erreicht [42]. Die höchste beschriebene Bakterienlast wurde mit  $10^3$  Keimen/ml bei der durch *E. coli* verursachten Sepsis bei Neugeborenen gefunden [42].

Die zweite Frage der Arbeit war, in welchem Verhältnis DNA : DNase vorliegen müssen, damit es in der PCR zu einem negativen Ergebnis kommt. So sollte

beurteilt werden, ob in der menschlichen Blutbahn die DNase Konzentration für eine Zerstörung der DNA ausreicht.

#### **4.1 Diskussion der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur**

Der Wirkmechanismus beispielsweise der  $\beta$ -Lactamantibiotika läuft über eine Störung der Zellwandsynthese [14]. In diesen Fällen wäre es vorstellbar, dass die Freisetzung der DNA durch Zellyse ausgeprägter ist als bei anderen Wirkstoffgruppen.

Bei den vier von uns verwendeten Antibiotika konnte ein geringer Unterschied in der Ausprägung der DNA-Freisetzung beobachtet werden, der aber unabhängig von der Störung der Zellwandsynthese war. Der größte Verlust wurde bei dem Cephalosporin beobachtet (28,4%), gefolgt von dem Gyrasehemmer (20,4%), dem Carbapenem (17,6%) und dem Aminoglycosid (14,8%). Cephalosporin und Carbapenem gehören beide zur Gruppe der  $\beta$ -Laktamantibiotika, die ihre Wirkung durch Hemmung der Zellwandsynthese entfalten [14]. Das Aminoglycosid bindet an die 30 S Untereinheit der 70 S Ribosomen und hemmt so die Proteinbiosynthese [14]. Auch dieses schädigt die Zellwand. Nur der Gyrasehemmer hat keinen Einfluss auf die bakterielle Zellwand, sondern hemmt die bakterielle DNA-Topoisomerase und verhindert so, dass die DNA ihre Quartärstruktur annimmt [14]. Dennoch zeigt sich in unseren Versuchen hier eine relativ hohe DNA-Freisetzung im Vergleich zu den anderen Antibiotika. Sie ist demnach von Faktoren abhängig, die bisher nicht zu erkennen sind.

Es muss bei der Bewertung dieser Ergebnisse berücksichtigt werden, dass die Konzentrationen der Antibiotika in unseren Proben relativ hoch lagen, um eine 100%ige Abtötung zu garantieren. Durch die hohen Antibiotika-Konzentrationen hätte es zu einer ausgeprägteren DNA-Freisetzung kommen können, als sie unter in vivo Bedingungen vorkommen kann. Da aber trotz der relativ hohen Konzentrationen in den Proben keine bedeutend höhere DNA-Freisetzung gegenüber den Kontrollen aufgetreten ist, ist es unwahrscheinlich, dass die DNA-

Freisetzung im lebenden Organismus bei geringeren Antibiotika-Konzentrationen höher ist.

In anderen Studien wurde teilweise eine höhere Freisetzung von DNA nach Antibiotikagabe festgestellt als in der vorliegenden Untersuchung. Walberg et al. [35] untersuchte das Verhalten der *E. coli*-DNA nach Inkubation mit Cefazidim, Ciprofloxacin und Gentamicin mittels Flowzytometrie. In diesem Vergleich zeigte sich der höchste DNA-Verlust bei Gentamicin, genaue quantitative Angaben des DNA-Verlustes fehlen leider. In einer weiteren Studie zu diesem Thema wurde bei *Legionella pneumophila* 3 h nach der Behandlung mit Penicillin G ein Verlust von 50% der radioaktiv markierten DNA festgestellt [39].

Die Größenordnung der DNA-Freisetzung könnte, abgesehen von dem Einfluss der Antibiotika, auch von der Beschaffenheit der Zellwand des jeweiligen Keimes abhängig sein. Bakterienhüllen können sehr verschieden aufgebaut sein, sie unterscheiden sich unter anderem durch ihre Eigenschaften in der Anfärbbarkeit. Manche Bakterien, wie beispielsweise Klebsiellen, sind sogar in der Lage, Kapseln zu bilden. Andere Keime können ausschließlich intrazellulär leben, wie etwa Rickettsien oder Chlamydien, oder sie besitzen gar keine bakterientypische Zellwand, wie etwa die Mycoplasmen. Deshalb muss unser Ergebnis in erster Linie für gramnegative Keime gelten. Es bleibt zu prüfen, in wie weit es auf den Nachweis von Keimen anderer Gruppen, auch Viren oder Pilze, übertragbar ist.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die DNA selbst nach Antibiotikagabe zum größten Teil nicht freigesetzt und zerstört wird und so weiterhin für die PCR als Template zur Verfügung steht. Außerdem wurde deutlich, dass selbst die freigesetzte bakterielle DNA nicht durch die im Serum normalerweise vorhandenen DNasen abgebaut wird.

Über die Aktivität der DNase I weiß man, dass sie in vitro in der Lage ist, doppelsträngige DNA zu Tri- oder Tetradeoxynucleotiden zu spalten [18, 21, 22, 29]. Ebenso ist bekannt, dass therapeutisch applizierte, synthetisch hergestellte Oligodeoxynucleotide in Säugerserum rasch durch DNase I abgebaut werden [7, 9]. Diese Aktivität der DNase I konnte in der vorliegenden Studie, was die Spaltung von bakterieller DNA in Serum bzw. Tris-HCl-Puffer betrifft, nicht bestätigt werden. Es ist ein Verhältnis von DNA : rhDNase I von mindestens  $1:10^6$  nötig, um 30 pg bakterieller DNA so weit zu zerstören, dass sie nicht mehr mittels PCR nachzuweisen ist. Die Konzentration von DNase I im menschlichen Serum beträgt 3,2 ng/ml [24]. Das bedeutet, dass pro ml maximal 3,2 fg gereinigte bakterielle DNA durch die DNase I abgebaut werden können. Bei einem mittleren DNA-Gehalt von 5 fg pro *E. coli* würde demnach in 1,56 ml Serum die DNA eines einzigen Keimes zerstört werden. Da nach unseren Ergebnissen aber maximal 28% der bakteriellen DNA freigesetzt wird, ist die Beeinträchtigung von PCR Ergebnissen durch die DNase I noch geringer, wie unten an einem klinischen Beispiel erläutert wird.

Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse über die Aktivität der DNase I können folgendermaßen erklärt werden: Erstens wird angenommen, dass im Serum Faktoren vorliegen, durch welche die Aktivität der DNase I gehemmt wird, wie z. B. eine hohe Konzentration von Natrium oder G-Actin [24, 28]. Zweitens wurden Histonen-ähnliche-Proteine beschrieben, die in die DNA-Struktur von Bakterien integriert werden und diese vor Zerstörung schützen [34]. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide weisen keine derartigen Proteine auf, wodurch sie im Serum schneller abgebaut werden können. Ihr therapeutischer Einsatz wird durch diesen raschen Abbau begrenzt.

Was die Ergebnisse dieser Studie für einen klinischen Fall bedeuten können, soll folgendes Beispiel verdeutlichen: Ein Patient hat eine *E. coli*-Bakteriämie von etwa 10 Keimen pro ml, die bei dieser Bakterienlast sowohl mittels Kulturverfahren, als auch mittels PCR nachzuweisen sein müsste. Es wird aber bereits vor Entnahme der Blutkultur eine bakteriziden Menge Cefotaxim

appliziert. Die Blutkultur wird nun mit hoher Wahrscheinlichkeit ein negatives Ergebnis zeigen. Wie sieht es mit der PCR aus? Es wurde gezeigt, dass etwa 70% der DNA noch innerhalb der Bakterienhüllen liegt, geschützt vor der Einwirkung der im Serum vorhandenen DNase I. Das entspricht in diesem Fall etwa der DNA von 7 Bakterien pro ml. Damit befinden wir uns noch innerhalb der Nachweisgrenze der verwendeten *E. coli*-PCR ( 1-10 *E. coli*/ml ). Wie gezeigt wurde wird aber selbst die freigesetzte DNA nur zu einem geringen Anteil durch DNasen zerstört, so dass Antibiotikatherapie und DNasen gemeinsam die Nachweisbarkeit von *E. coli* mittels PCR bei dieser Bakterienkonzentration nur um etwa 20% beeinträchtigen können. Also wäre die DNA von ca. 8 *E. coli* / ml noch vorhanden und der Keim wäre trotz Antibiotikagabe mit hoher Wahrscheinlichkeit mittels PCR nachzuweisen.

Die Bakterienkonzentration im Blut bei Sepsis liegt bei Kindern oft höher als bei Erwachsenen, es wurden Konzentrationen von über 100 CFU/ml nachgewiesen [42]. Mit steigender Bakterienlast wird ein Nachweis mittels PCR immer sicherer, da sowohl Antibiotika als auch DNasen die Detektionsrate immer weniger beeinflussen können.

Schwierig wird es hingegen, wenn wir es mit einer sehr geringen Bakterienlast von weniger als 1 CFU/ml zu tun haben, da hier die PCR an ihre Nachweisgrenzen stößt. Wie klinisch relevant sind Bakteriämien mit ausgesprochen geringer Bakterienlast? Kreger et al. [16] konnten zeigen, dass eine Relation zwischen Höhe der Bakterienlast und Mortalität besteht, nicht aber zwischen Bakterienlast und Schwere der Grunderkrankung. Im Vergleich von Patienten mit ähnlicher Grunderkrankung und gramnegativer Sepsis hatten diejenigen mit einer Bakterienlast von >10 CFU/ml Blut eine deutlich schlechtere Prognose. Whimbey et al. [40] untersuchte die Bakterienlast bei 15 Patienten mit *Staphylococcus aureus* Sepsis, die von zentralen Venenkathetern ausging und fand eine direkte Relation zwischen Bakterienlast und metastatischen Komplikationen: 6 von 7 Patienten mit >100 CFU/ml zeigten metastatische Komplikationen, 3 von ihnen starben. Von den 7 Patienten mit <10 CFU/ml entwickelte keiner

metastatische Komplikationen, sie überlebten. Der 15. Patient hatte 20 CFU/ml und entwickelte keine Komplikationen.

Es wird hierbei deutlich, wie wichtig eine schnelle Diagnose ganz besonders bei hohen Bakterienkonzentrationen von über 10 CFU/ml ist. In diesen Bereichen kann die PCR, wie wir gezeigt haben, sogar unter Antibiotikatherapie eine Bakteriämie mit hoher Sicherheit nachweisen.

## **4.2 Schlussfolgerung**

In dieser Studie wurde gezeigt, dass die PCR eine vielversprechende Methode zum Nachweis von Bakteriämien ist. Es darf aber nicht vergessen werden, dass wir in unseren Versuchen mit einer für *E. coli* spezifischen PCR gearbeitet haben, die in einer vorherigen Studie etabliert worden war. Wenn man die PCR hingegen im klinischen Alltag zur Suche nach Bakteriämien einsetzen will, dann muss dies mit einer Breitspektrums-PCR geschehen, da in diesen Fällen der Keim noch nicht bekannt ist und ein möglichst großes Spektrum möglicher Erreger erfasst werden soll. Hier tritt das Problem auf, dass diese ein größeres Erregerspektrum abdeckende PCR wesentlich empfindlicher gegenüber Verunreinigungen durch bakterielle DNA ist als eine keimspezifische PCR. Beispielsweise können Spuren der DNA von zur Produktion der rekombinanten *Taq*-Polymerase eingesetzten Bakterien die PCR stören, da jeder auch nur in Spuren vorhandene Keim angezeigt werden soll.

Es konnte nachgewiesen werden, dass es nach Antibiotikagabe nur zu einer geringen Freisetzung bakterieller DNA im menschlichen Blut kommt. Außerdem wird freie DNA nur zu einem kleinen Anteil von im Serum vorliegenden DNasen abgebaut. Diese geringe Freisetzung im Zusammenhang mit der hohen Stabilität bakterieller DNA im Blut könnte eine vielversprechende Grundlage sein für eine ausführliche Erprobung und schließlich die Etablierung der PCR Technik als Ergänzung der kulturellen Verfahren zum Nachweis von Bakteriämien, ganz besonders nach Antibiotikagabe, im klinischen Alltag.

## 5. Zusammenfassung

Die Blutkultur gilt als der Goldstandard zum Nachweis von Bakteriämien bei septischen Krankheitsbildern, hat aber eine deutliche Schwachstelle, da sie bei mit Antibiotika vorbehandelten Patienten oft falsch-negativ ausfällt. Für diesen Fall konnte die spezifische *E. coli*-PCR bereits ihre Stärke gegenüber der Blutkultur beweisen, da sie in der Lage ist, die Bakterien unabhängig von deren Vermehrungsfähigkeit nachzuweisen. Dennoch könnten im Blut vorhandene DNasen die bakterielle DNA nach Lyse des Bakteriums spalten und so zu einem falsch-negativen PCR-Ergebnis führen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstens durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht, welcher Anteil der bakteriellen DNA aus der Bakterienhülle freigesetzt wird, nachdem diese Bakterien durch Antibiotika abgetötet wurden. Der DNA-Verlust betrug nur 14,8% - 28,4%, der größere Teil der DNA blieb vor dem Angriff von im Serum vorhandenen DNasen geschützt in der Bakterienhülle. Zweitens wurde die Bedeutung von DNasen für das Auftreten von falsch-negativen PCR-Ergebnissen überprüft. Es wurden sowohl gereinigte *E. coli*-DNA als auch durch Antibiotika abgetötete *E. coli* in Serum mit rekombinanter humaner DNase I in steigender Konzentration inkubiert und anschließend in eine *E. coli*-spezifische PCR eingesetzt. Der Versuch wurde außerdem in einem Tris-HCl-Puffer an Stelle des Serums durchgeführt, der optimale Bedingungen für die DNase-Aktivität schafft. Das Ergebnis zeigt, dass die freie bakterielle DNA im Serum sehr stabil ist. Erst bei einer Gewichtsrelation der DNA : DNase von 1 : 10<sup>6</sup> wurde eine signifikante Abnahme der positiven PCR-Ergebnisse festgestellt. Bei den abgetöteten *E. coli* konnte die DNase die positiven PCR-Ergebnisse selbst bei einer Gewichtsrelation der DNA : DNase von 1 : 10<sup>9</sup> nicht signifikant vermindern ( $p > 0,05$ ). Diese Ergebnisse zeigen, dass nach dem Abtöten der Bakterien durch Antibiotika sowohl die Freisetzung der bakteriellen DNA als auch die DNase-Aktivität im Serum zu gering sind, um die Aussagekraft der PCR beim Nachweis von Bakteriämien zu beeinträchtigen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Aitken ML, Burke W, McDonald G, Shak S, Montgomery AB, Smith A.** Recombinant human DNase inhalation in normal subjects and patients with cystic fibrosis. *JAMA* 1992; 267: 1947-1951.
2. **Altmann DG.** Comparing groups-categorical data. In: Chapman and Hall, ed. *Practical statistics for medical research*. London: 1991: 229-276.
3. **Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ.** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644-1655.
4. **Chitrabamrung S, Rubin RL, Tan EM.** Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* 1981; 1: 55-60.
5. **Cursons RT, Jeyerajah E, Sleigh JW.** The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 1999; 27: 937-940.
6. **Darby JM, Linden P, Pasculle W, Saul M.** Utilization and diagnostic yield of blood cultures in a surgical intensive care unit. *Crit. Care Med.* 1997; 25: 989-994.
7. **Fiorenza MT, Mangia F.** Quantitative RT-PCR amplification of RNA in single mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biotechniques* 1998; 24: 618-623.
8. **Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM.** CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am. J. Infect. Control.* 1988; 16: 128-140.
9. **Gupta S, Herriot RM.** Nucleases and their inhibitors in the cellular components of human blood. *Arch. Biochem. Biophys.* 1963; 101: 88-95.

10. **Hahn H., Großgebauer K., Klein P.** Labordiagnostische Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen. In: Hahn H., Falke D. Klein P., eds. Medizinische Mikrobiologie. Berlin, Heidelberg, Springer, 1994: 233-246.
11. **Heininger A, Binder M, Schmidt S, Unertl K, Botzenhart K, Doring G.** PCR and blood culture for detection of Escherichia coli bacteremia in rats. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 2479-2482.
12. **Henry NK, McLimans CA, Wright AJ, Thompson RL, Wilson WR, Washington JA.** Microbiological and clinical evaluation of the isolator lysis-centrifugation blood culture tube. J. Clin. Microbiol. 1983; 17: 864-869.
13. **Higuchi R.** Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich HS, ed. PCR Technology: principles and applications for DNA Amplification. New York: 1998: 31-38.
14. **Karow T, Lang R.** Antibiotika. In: Karow T, Lang R. eds. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage. Köln, Karow, 1999:505-548.
15. **Kiehn TE, Wong B, Edwards FF, Armstrong D.** Comparative recovery of bacteria and yeasts from lysis-centrifugation and a conventional blood culture system. J. Clin. Microbiol. 1983; 18: 300-304.
16. **Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR.** Gram-negative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. Am. J. Med. 1980; 68: 332-343.
17. **Ley BE, Linton CJ, Bennett DM, Jalal H, Foot AB, Millar MR.** Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1998; 17: 247-253.
18. **Love JD, Hewitt RR.** The relationship between human serum and human pancreatic DNase I. J. Biol. Chem. 1979; 254: 12588-12594.
19. **Martin MA.** Epidemiology and clinical impact of gram-negative sepsis. Infect. Dis. Clin. North Am. 1991; 5:739-752.
20. **McKenzie R, Reimer LG.** Effect of antimicrobials on blood cultures in endocarditis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1987; 8: 165-172.

21. **Nadano D, Yasuda T, Kishi K.** Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin. Chem.* 1993; 39: 448-452.
22. **Peitsch MC, Polzar B, Tschopp J, Mannherz HG.** About the involvement of deoxyribonuclease I in apoptosis. *Death and Differentiation* 1994; 1: 1-6.
23. **Polzar B, Zanotti S, Stephan H, Rauch F, Peitsch MC, Irmeler M, Tschopp J, Mannherz HG.** Distribution of deoxyribonuclease I in rat tissues and its correlation to cellular turnover and apoptosis (programmed cell death). *Eur. J. Cell Biol.* 1994; 64: 200-210.
24. **Prince WS, Baker DL, Dodge AH, Ahmed AE, Chestnut RW, Sinicropi DV.** Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum. *Clin. Exp. Immunol.* 1998; 113: 289-296.
25. **Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP.** Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10: 444-465.
26. **Rohner P, Pepey B, Auckenthaler R.** Advantage of combining resin with lytic BACTEC blood culture media. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2634-2638.
27. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
28. **Shevelev IV, Legina OK, Tutaev KI, Krutiakov VM.** Strong inhibition of endodeoxyribonuclease activity at physiological ionic strength values. *Mol. Biol. (Mosk.)* 1998; 32: 741-744.
29. **Sinicropi D, Baker DL, Prince WS, Shiffer K, Shak S.** Colorimetric determination of DNase I activity with a DNA-methyl green substrate. *Anal. Biochem.* 1994; 222: 351-358.
30. **Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H.** Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2045-2054.

31. **Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Hacker H, Heeg K, Wagner H.** Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur.J.Immunol.* 1997; 27: 1671-1679.
32. **Spencer RC.** Blood cultures: where do we stand? *J. Clin. Pathol.* 1988; 41: 668-670.
33. **Suri R, Metcalfe C, Lees B, Grieve R, Flather M, Normand C, Thompson S, Bush A, Wallis C.** Comparison of hypertonic saline and alternate-day or daily recombinant human deoxyribonuclease in children with cystic fibrosis: a randomised trial. *Lancet* 2001. Oct.20.; 358. (9290.): 1316.-21. 358:1316-1321.
34. **Tsui P, Freundlich M.** Integration host factor binds specifically to sites in the *ilvGMEDA* operon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 1988; 203: 817-820.
35. **Walberg M, Gaustad P, Steen HB .** Rapid assessment of ceftazidime, ciprofloxacin, and gentamicin susceptibility in exponentially-growing *E. coli* cells by means of flow cytometry. *Cytometry* 1997; 27: 169-178.
36. **Washington JA.** Blood cultures: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1989; 8: 803-806.
37. **Weinstein MP.** Current blood culture methods and systems: clinical concepts, technology, and interpretation of results. *Clin. Infect. Dis.* 1996; 23: 40-46.
38. **Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, Lichtenstein KA.** The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev. Infect. Dis.* 1983; 5: 35-53.
39. **Weisholtz S, Tomasz A.** Response of *Legionella pneumophila* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 27: 695-700.
40. **Whimbey E, Kiehn TE, Brannon P, Benezra D, Armstrong D.** Clinical significance of colony counts in immunocompromised patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Infect. Dis.* 1987; 155: 1328-1330.

41. **Wilson ML, Weinstein MP.** General principles in the laboratory detection of bacteremia and fungemia. *Clin. Lab. Med.* 1994; 14: 69-82.
42. **Yagupsky P, Nolte FS.** Quantitative aspects of septicemia. *Clin.Microbiol.Rev.* 1990; 3: 269-279.
43. **Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD.** Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 596-601.

## 5 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. Gerd Döring für die freundliche Überlassung des Themas für meine Dissertation sowie für die zahlreichen Ratschläge und die geduldige Betreuung dieser Arbeit.

Ganz herzlich danke ich auch Frau Dr. Alexandra Heiningen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, für die unermüdliche, stets konstruktive Unterstützung bei der Erstellung und Durchführung der Versuche, für die geduldige Hilfe bei Problemen aller Art und die Durchsicht der Texte.

Ich möchte mich auch bei Frau Dr. Martina Ulrich und dem gesamten Team des Hygieneinstitutes für die Unterstützung in der Durchführung und Auswertung der Versuche und für unzählige wertvolle technische Hilfestellungen bedanken.

Mein Dank gilt auch C. Meisner von dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung für freundliche Beratung bei der statistischen Datenauswertung.

Für die unermüdliche, sorgfältige Durchsicht und Korrektur der Texte sowie wertvollen Ratschlägen zur Darstellung der Arbeit danke ich herzlichst Monika Müller-Schauenburg.

Herzlichen Dank auch an meine Freunde und meine Familie für die Begleitung und Unterstützung dieser Arbeit durch fruchtbare Gespräche, geduldiges Zuhören und unermüdliche Motivation. Ganz besonderer Dank gilt hier meinem Vater, meiner Schwester, Volker Benseler und Matthias Klingele.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Almut Müller-Schauenburg  
Geburtsdatum: 24.1.1974  
Geburtsort: Tübingen  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1980-1993: Freie Waldorfschule Marburg  
1990: 1-jähriger Auslandsaufenthalt in Osvaldo Cruz /SP, Brasilien über die Austauschorganisation AFS (American Field Service)  
06/1993: Abitur

### Pflegepraktika:

07-08/1993: Tropenlinik, Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen  
09-11/1993: Clínica Tobias, Sao Paulo, Brasilien  
05-07/1994: Tropenlinik, Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen

### Hochschulausbildung:

10/1994: Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen  
08/1997: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2000: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2000: Prakt. Jahr:  
Innere Medizin – Städtisches Krankenhaus Sindelfingen  
Chirurgie- Städtisches Krankenhaus Sindelfingen und Hospital Universitário de Florianópolis / Brasilien  
Gynäkologie- Städtisches Krankenhaus Sindelfingen  
05/2001: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Famulaturen:

03/1997: Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Rottenburg  
03/1998: Chirurgie, St. Elisabeth- Hospital, Bochum  
09/1998: Gynäkologie, LKH Villach, Österreich  
03/1999: Tropenmedizin, Hospital de Doencas tropicais, Maceió, Brasilien  
08/1999: Gynäkologie, Praxis Dr. Straußinsky, Tübingen

### Ärztin im Praktikum:

01.11.2001- und  
30.04.2003 Städtische Kliniken Esslingen, Abteilung für Gynäkologie  
Geburtshilfe

### Assistenzärztin:

seit 01.05.2003 Städtische Kliniken Esslingen, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe