

Polymerasekettenreaktion

Die besten Ideen sind oft einfach

PCR ist eine „biologische Kettenreaktion“, mit deren Hilfe Erbsubstanz im Labor vermehrt werden kann. Sie ist Grundlage vieler diagnostischer Verfahren, z.B. von Gen- oder AIDS-Tests. Im Routinelabor wird sie zunehmend automatisiert durchgeführt.

Der Regisseur Steven Spielberg zeigt in seinem Film „Jurassic Park“, der 1993 die Kinos stürmte und alle Kassenrekorde brach, wie aus genetischem Material von Dinosaurierknochen lebende Tiere erschaffen werden. Die Story ist natürlich Fiktion, die der Geschichte zugrunde liegende Technik der Polymerase Chain Reaction (PCR) hingegen ist real und heute aus modernen Laboratorien nicht mehr wegzudenken. Sie gehört zu den re-

aber inzwischen ein bedeutendes Segment im Diagnostikmarkt entwickelt und somit die Investition von Roche als eine sehr gute Entscheidung bestätigt. Mittlerweile sind zwar verschiedene PCR-Basispatente in den USA ausgelaufen und für Europa wird dies im nächsten Frühjahr der Fall sein. Neben diesen Basispatenten im Bereich der qualitativen PCR hält Roche jedoch eine Vielzahl von Patenten für die quantitative PCR und hat somit ideale Voraussetzungen für weitere Entwicklungen auf dem Gebiet der PCR-Technologie.

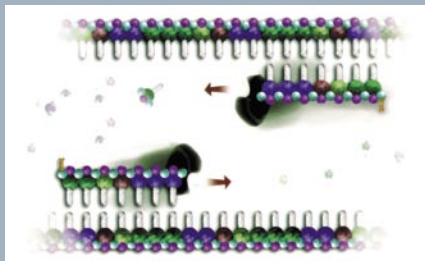
Die Patentabsicherung geistigen Eigentums (intellectual property, kurz IP) und die darauf basierenden Lizenzannahmen bedeuten für die forschende Diagnostikindustrie nicht nur einen Schutz vor Produktnachahmern, sie tragen auch ganz we-

Tatort sichergestellte Haare, Blut, Speichel oder Sperma genügen, um den Täter mit einem genetischen Fingerabdruck zu identifizieren. Gängige Vaterschaftstests beruhen ebenfalls auf dem PCR-Verfahren, sie vergleichen die DNA von Eltern und Kindern. In der Lebensmittelanalytik wird die PCR zum Beispiel zum Nachweis von Keimen oder von genverändertem Mais und Soja eingesetzt.

Das Potenzial ist damit längst nicht ausgeschöpft. Zu den modernen PCR-basierten Tests gehört auch der AmpliChip® CYP 450, der erste DNA-Chip für die klinische Routinediagnostik, der analysiert, ob und wie schnell ein Mensch bestimmte Medikamente verstoffwechseln kann. Diese Information gibt dem Arzt wertvolle Hinweise für die Therapieentscheidung. Mit Hilfe weiterer Tests ist es möglich, die individuelle Veranlagung für Krebs frühzeitig zu erkennen, um Aussagen über den Verlauf einer bereits vorliegenden Erkrankung oder die richtige Therapieentscheidung für eine optimale Behandlung treffen zu können.

Der COBAS® TaqMan® von Roche Diagnostics ist ein vollautomatisiertes Real-Time PCR System speziell für die molekularbiologische Routinediagnostik: Er vervielfältigt und detektiert Nukleinsäuren von Krankheitserregern mit hoher Sensitivität und Spezifität. Bereits nach acht Stunden liegen dem Labor die Ergebnisse von 96 Proben vor. Mit dem COBAS® AmpliPrep kann man auch die Probenvorbereitung über eine Dockingstation anschließen. So entsteht eine Komplettlösung für den Hochdurchsatz-Routinebetrieb. Mit dem COBAS® TaqMan® ist es möglich, empfindliche PCR-Tests in breiten dynamischen Messbereichen durchzuführen – eine Voraussetzung für die moderne Virusdiagnostik und das Therapiemonitoring. Amplifikation und Detektion finden in einem geschlossenen Gefäß ohne weitere Pipettierschritte statt. Damit wird das Kontaminationsrisiko minimiert. Nach dem Ende der PCR sind keine weiteren Schritte mehr notwendig, denn die Messung der PCR-Produkte erfolgt dank Real-Time-Technologie bereits während der Amplifikation. ■

Dr. Burkhard Ziebolz
Roche Diagnostics
burkhard.ziebolz@roche.com



Die PCR ist ein Verfahren zur spezifischen Vervielfältigung von Erbmaterial. Der DNA-Doppelstrang wird durch Erhitzung in zwei Einzelstränge getrennt. Nach Abkühlung lagern sich an zwei ganz bestimmten Stellen kurze synthetische Stränge, die Primer, an. Sie dienen als Startmoleküle für das Enzym Taq-Polymerase, das an jedem Einzelstrang die Erbinformation abliest, kopiert und so die DNA-Menge verdoppelt.

volutionärsten Technologien in der Life Science-Forschung und beruht wie viele geniale Erfindungen auf einem einfachen Prinzip:

Die natürliche Verdoppelung der Erbinformation, die bei jeder Zellteilung stattfindet, wird im Reagenzglas nachgeahmt. So entstehen aus einem DNA-Molekül zwei, daraus vier, acht, sechzehn usw. Schon nach zehn Verdopplungszyklen liegen über 1000 Moleküle (genau 2¹⁰) vor, und in nur zwei Stunden entstehen Millionen identischer DNA-Stücke. Aus winzigen DNA-Spuren können auf diese Weise große Mengen Erbsubstanz hergestellt werden, die für eine medizinische Analyse ausreichen.

Kary Mullis, der die PCR 1983 erfand, erhielt dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie. 1987 verkaufte er dem Biotech-Unternehmen Cetus das Patent. Als Roche 1992 die weltweiten Rechte für 320 Millionen US-Dollar von Cetus erwarb, wurde der Kaufpreis allgemein als zu hoch erachtet. Auf der Basis dieser Technologie hat sich

sentlich zum Firmenwert bei. Besonders in der Routinediagnostik hat eine eindeutige Patentlage hohe Bedeutung für den Hersteller und die Nutzer des Verfahrens.

Mittlerweile findet die PCR breite Anwendung in der Medizin. Durch Automatisierung konnte die Durchführung deutlich vereinfacht und der Probendurchsatz erhöht werden. Eine spezielle Variante, die Real-Time-PCR, erlaubt die schnelle quantitative Messung der DNA-Menge in Proben während der Amplifikation.

Zahlreiche Krankheiten werden heute auf Basis von PCR-Tests diagnostiziert. So ist es möglich, die Erreger von z.B. AIDS, Hepatitis und Sepsis über ihre Nukleinsäuren zu identifizieren. Besonders wichtig für das Gesundheitswesen ist der Einsatz in Blutbanken; hier werden Blutkonserven mit Hilfe der PCR-Technologie standardisiert daraufhin analysiert, ob sie mit bestimmten Pathogenen, wie zum Beispiel dem HI- oder Hepatitis C-Virus, kontaminiert sind. Die Gerichtsmedizin ist ein weiteres Anwendungsgebiet: Am

PCR in der Routine

Innovativer Test für Erbkrankheiten

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) ist eine neue Methode, mit der sowohl Deletionen als auch Insertionen (fehlende oder zusätzliche Gensequenzen) als Ursache von Erbkrankheiten ermittelt werden können. Beim Einsatz in der Routine lassen sich in einer einzigen Reaktion bis zu 40 verschiedene Genbereiche untersuchen.

Im Jahr 2002 entwickelte die holländische Gruppe um Dr. J.P. Schouten mit der MLPA ein neues Verfahren für die Gendiagnostik. Heute, nur drei Jahre später, wird es bereits in der Routine angeboten.

Die Ursachen für genetisch bedingte Erkrankungen sind vielfältig. Neben dem Austausch einzelner Bausteine, den so genannten Punktmutationen, kann das Auftreten ein und derselben Erbkrankheit auch am Fehlen (Deletion) oder am zusätzlichen Vorhandensein (Insertion) ganzer Genbereiche liegen. Diese Unterschiede sind für die Diagnostik oft von entscheidender Bedeutung. Bislang wurde für den molekulargenetischen Nachweis von Erbkrankheiten hauptsächlich die Sequenzierung der jeweiligen Genbereiche sowie die Southern-Blot Analyse und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als Standardmethoden eingesetzt. Während die Sequenzierung zum Nachweis von Punktmutationen, z.B. bei hereditärem Brustkrebs, als Goldstandard betrachtet werden kann, ließ sich die Deletion oder die Insertion einzelner oder mehrerer Exons, also der kodierenden Bereiche eines Gens, nicht immer eindeutig nachweisen.

Die zum Deletionsnachweis bisher verwendeten Methoden wie die molekularzytogenetische Technik der FISH-Analyse oder die Southern-Blot Technik, bei der DNA-Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Hybridisierung auf einer Membran mit spezifischen Sonden nachgewiesen werden, sind zur Klärung routinediagnostischer Fragestellungen zu aufwendige Verfahren bzw. für eine Quantifizierung nur bedingt einsetzbar.

Neuere Techniken wie die Real Time PCR sind noch in der Etablierungsphase

Derzeit bei Bioscientia verfügbare und in Entwicklung () befindliche Routinetests, die eine MLPA einschließen und eine schnelle und einfache Diagnostik verschiedener Erbkrankheiten erlauben.*

und kommerziell zumindest zurzeit noch nicht erhältlich.

In den Laboren des Instituts Bioscientia-Zentrum für Humangenetik, Ingelheim, wurden auf Basis der MLPA-Technik neue Testverfahren zum Nachweis von Erbkrankheiten, die durch Deletion oder Insertion großer Gensegmente charakterisiert sind, etabliert. Mit dem neuen Verfahren können jetzt z.B. Varianten des Von-Hippel-Lindau-Syndroms (VHL-Syndrom) oder der Muskeldystrophie Duchenne reproduzierbar nachgewiesen werden.

In einer Analysenreihe konnte mit der neuen Technologie bei mindestens sechs von 18 Familien, bei denen es bisher nicht möglich gewesen war, den VHL Gendefekt molekulargenetisch zu detektieren, eine größere intragenetische Deletion sicher nachgewiesen werden. So wurde es möglich, Mutationsträger bereits vor dem Auftreten von Symptomen als solche zu identifizieren. Der Vorteil des neuen Testsystems liegt darin, dass in einer einzigen Multiplex-Reaktion bis zu 40 Gensequenzen parallel analysiert und quantifiziert werden können.

Die nach der aufwendigen Etablierung prinzipiell einfache Durchführbarkeit der MLPA ermöglicht die zeitgleiche Untersuchung von bis zu 96 Proben. Mit der MLPA steht somit ein innovatives Verfahren zur Verfügung, das das Spektrum etablierter Methoden im Routinelabor deutlich erweitern wird. ■

Dr. Gabriele Wildhardt,
Dr. Klaus-Ulrich Lentjes
Bioscientia - Zentrum für
Humangenetik, Ingelheim
www.bioscientia.de

Vier Schritte zum Ergebnis

Der MPLA-Prozess besteht aus vier Schritten: Denaturierung, Bindung der Sonden, Ligation und Amplifikation. Für jeden zu untersuchenden Genabschnitt gibt es zwei Sonden. Wenn beide Sonden mit der Zielsequenz hybridisieren, können sie im nächsten Reaktionsschritt miteinander verbunden (ligiert) werden. Mit nur einem einzigen PCR-Primerpaar können anschließend alle ligierten Sonden in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden.

Jedes Reaktionsprodukt ist an einem Ende mit einem DNA-Teilstück (Stuffer Fragment) variabler Länge versehen, um eine elektrophoretische Auftrennung zu ermöglichen. Auf diese Weise können in einem Reaktionsansatz und einer einzigen Auftrennung bis zu 40 Gensequenzen parallel untersucht werden. Dabei ist die Menge des Amplifikationsproduktes direkt proportional zur Ausgangsmenge der Zielsequenz, die eine erfolgreiche Anlagerung und Ligation der Sonden möglich gemacht hat. Die bis zu 40 verschiedenen Amplifikationsprodukte mit einer Länge zwischen ca. 130 bis 480 bp werden vorzugsweise mittels der Kapillarelektrophorese separiert und quantifiziert. Die Methode zeichnet sich durch eine sehr hohe Reproduzierbarkeit aus. Eine Zunahme der Kopienzahl eines einzigen Exons von z.B. zwei auf drei Kopien/diploides Genom kann in 20-500 ng humaner DNA-Probe problemlos nachgewiesen werden. Somit werden Deletionen und Duplikationen eindeutig quantifizierbar.

Erkrankung	Mutiertes Gen
Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom)	VHL-Tumorsuppressorgen
Rett-Syndrom *	MECP2
Spinale Muskelatrophie	SMN1/SMN2
Leri-Weill-Syndrom	SHOX
Tuberöse Sklerose *	TSC1/TSC2
Multiple endokrine Neoplasie *	MEN1
Muskeldystrophie Duchenne/Becker	DMD
Hypercholesterinämie *	LDLR
Mukoviszidose	CFTR
Neurofibromatose Typ1	NF1
Aniridie	PAX6
Dopa-responsive Dystonie	GCH1

PCR-basierter Erregernachweis

Schnelle Infektionsdiagnostik zahlt sich aus

Molekularbiologische Methoden erlauben eine schnelle und hochsensitive Diagnostik von infektiösen Atemwegserkrankungen. Ein frühzeitiger Nachweis der Erreger mittels DNA-Analytik kann durch den gezielten Einsatz einer Erfolg versprechenden Therapie zu deutlichen Kosteneinsparungen im Gesundheitswesen führen.

Wie jedes Jahr erkranken auch in diesen Sommermonaten wieder viele Menschen an der so genannten Sommergrippe. Es handelt sich um eine relativ harmlose akute Erkältungskrankheit, die hauptsächlich durch Enteroviren ausgelöst wird und mit Schnupfen, Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen einhergeht.

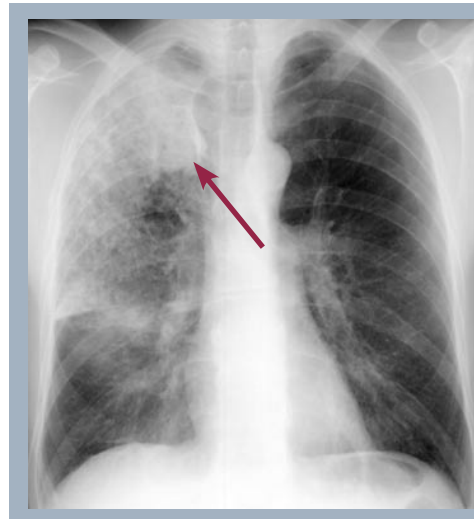
Diese Symptome sind im Frühstadium allerdings denjenigen der echten Grippe, der Influenza, zum Verwechseln ähnlich. Ihr fallen in Deutschland jährlich bis zu 10.000 Menschen zum Opfer; im Zuge weltweiter Seuchen kann die Zahl der Todesfälle in die Millionen gehen. Verantwortlich für solche Pandemien ist das Influenza-Virus Typ A, während Typ B eher lokal auftritt.

Die zu den RNA-Viren gehörenden Influenza-Erreger richten sich hauptsächlich gegen die Flimmerhaare der Atemwege, so dass es nach Beeinträchtigung der zellulären Immunität zu schweren sekundären Lungenentzündungen kommen kann. Entscheidend für eine erfolgreiche Grippebehandlung ist das frühzeitige Erkennen der Erkrankung. Der Erreger vermehrt sich in den Epithelien des Atemtrakts und breitet sich dort explosionsartig innerhalb von zwei bis drei Tagen aus. Nur wenn innerhalb der ersten 48 Stunden und dem Auftreten der ersten Symptome antiviral behandelt wird, ist noch eine therapeutische Wirkung erreichbar. Die Behandlung durch neuartige Neuraminidasehemmer kann die Infektion stoppen; eine unspezifische und aufwendige symptomatische Behandlung, die nach Verstreichen der 48 Stunden notwendig ist, entfällt somit.

Mit dem Influenza-Virus-PCR-Labortest steht ein Verfahren zur Verfügung, das Influenza-RNA mit Hilfe einer Variante der Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) aus dem Rachenabstrich oder Sputum sicher und schnell nachweisen kann. Treffen die Patientenproben bis Mittag im Labor ein, so steht noch am gleichen Tag ein zuverlässiges Ergebnis zur Verfügung. Bei

nachmittags eintreffenden Proben liegt das Ergebnis spätestens am darauf folgenden Vormittag vor.

Die Kosten für eine Analyse liegen bei 40 Euro. Obwohl der Test hohe Folgekosten verhindern kann, kommen die gesetzlichen Krankenkassen für diese Analysen in der Regel nicht auf. Zwar führen die Landesämter für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit den Labortest für ausgewählte Arztpraxen auch kostenlos durch, aber meist dauert es viel zu lange, bis die Proben in den entsprechenden Ämtern und die Ergebnisse wieder beim behandelnden Arzt sind.



Pneumonien stellen unter den Infektionskrankheiten in den Industrieländern die häufigste Todesursache dar und treten vorrangig bei älteren Menschen oder Personen mit geschwächtem Immunsystem auf. Die Behandlung einer Lungenentzündung ist abhängig vom Erreger. Neben Bakterien und Viren kommen hierfür auch Pilze und andere Parasiten in Frage. Die entzündeten Bereiche sind durch Ansammlung von Entzündungszellen und Flüssigkeit für Röntgenstrahlen weniger durchlässig und erscheinen deshalb aufgehellt (sog. Verschattungen, siehe Pfeil).

Nicht nur die Grippe, sondern auch die atypische Lungenentzündung ist ein Beispiel für den Wert molekulargenetischer Analysemethoden im Routinelabor. Atypische Pneumonien, die vor allem bei jüngeren Erwachsenen und Jugendlichen auftreten, zeichnen sich durch ein schleichendes Einsetzen der Symptome aus. Als gefährliche Komplikation kann sich die Entzündung durch Verschleppung der Erreger auf andere Organe ausweiten. Als Krankheitsursache gelten vor allem drei Erreger: *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* sp. und *Chlamydomphila pneumoniae*.

Eine frühzeitige und eindeutige Identifizierung eines dieser Erreger gelang bisher nur selten. Klassische Methoden wie die Serologie liefern erst Ergebnisse, wenn der menschliche Organismus bereits Antikörper gebildet hat. Die direkte Anzucht und Kultur der Erreger ist aufgrund der hohen Ansprüche an Medium und Wachstumsbedingungen sehr schwierig und langwierig. Myko-

plasmen-Kulturen werden z.B. in der Regel bis zu zwei Wochen inkubiert, wobei erste positive Ergebnisse frühestens nach fünf bis sieben Tagen zu erwarten sind. Chlamydien sind - wenn überhaupt - nur in speziellen Zellkulturen kultivierbar. Die Anzucht von *Chlamydomphila pneumoniae* ist kaum realisierbar. Ähnlich verhält es sich mit Legionellen, bei denen schon längere Transportzeiten eine erfolgreiche Anzucht verhindern.

Ein neuer Nachweis erlaubt jetzt die Detektion der drei unterschiedlichen Bakterien bereits nach wenigen Stunden. Mittels

Real-Time-PCR erfolgt der molekulargenetische Nachweis an einem LightCycler-Gerät. So lassen sich innerhalb eines Tages Patientenproben mit hoher Sensitivität und Reproduzierbarkeit analysieren. Langwierige Inkubations- und Wartephasen, die in der Serologie unvermeidlich sind, entfallen komplett.

Obwohl die DNA-Analytik teurer ist als serologische Methoden, könnte diese schnelle Diagnostik mittelfristig eine deutliche Senkung der Krankenhauskosten bewirken, da sich in vielen Fällen die Verweildauer von Patienten durch eine frühzeitige Diagnose oder durch die Wahl einer geeigneten Therapie deutlich verringert. ■

os

Dres. Fred Buchwald und
Andreas Lindauer
Medizinisches
Versorgungszentrum Weiden
Tel.: 0961/309-140
www.synlab.de

Die COBAS®-Familie

Automatisierte molekulare Routinediagnostik mit breitem Parametermenü



COBAS® AmpliPrep mit dem über eine Dockingstation verbundenen COBAS® TaqMan®.

Roche

COBAS® AMPLICOR®

Die automatisierte molekulare Routinediagnostik mit breitem Parametermenü

Der COBAS® AMPLICOR® führt als erstes PCR-System Amplifikation und Detektion in einem einzigen Gerät vollautomatisiert durch. Das Gerät liefert zuverlässige und validierte Ergebnisse innerhalb weniger Stunden. Der Personalaufwand ist im Vergleich zu manuellen Methoden erheblich verringert: vorbereitete Proben einsetzen, Reagenzien laden, die gewünschten Tests auswählen, und der Lauf startet per Knopfdruck. Durch AmpErase® und die automatische Pipettierung durch verschlossene Deckel der Reagenzkassetten wird ein optimaler Schutz vor Kontaminationen gewährleistet. Für die molekulare Infektionsdiagnostik steht ein breites Spektrum an CE-zertifizierten Test-Kits zur Verfügung. Sie ermöglichen den Nachweis und die Quantifizierung von Viren (HCV, HIV-1, HBV, CMV) und Bakterien (C. trachomatis, N. gonorrhoeae, M. tuberculosis).

COBAS® TaqMan® 48

Zeit- und Qualitätsgewinn durch Real Time PCR

Der COBAS® TaqMan® 48 ist das erste CE-markierte Real Time PCR-System für die In-vitro-Diagnostik. Amplifikation und Detektion erfolgen nach dem TaqMan-Prinzip in einem geschlossenen System ohne weitere Pipettierungen. Die manuellen Arbeiten und das Kontaminationsrisiko reduzieren sich damit auf ein Minimum. Da während der Amplifikation bereits die Detektion erfolgt, verkürzen sich die Analysezeiten deutlich. Als Plattform mit zwei unabhängigen Thermocyclern à 24 Proben erlaubt der COBAS® TaqMan® 48 flexible Parameterkombinationen und liefert bis zu 144 Ergebnisse pro Tag. Die verfügbaren CE-markierten Tests zeichnen sich durch hohe Sensitivität und breite dynamische Messbereiche aus.

COBAS® AmpliPrep

COBAS® TaqMan®

Real Time PCR in der Vollautomatisierung

Zur vollständigen Automatisierung aller Arbeitsabläufe von der Probenaufarbeitung bis zur Ergebnisausgabe ist es möglich, das Probenvorbereitungssystem an den COBAS® TaqMan® über eine Dockingstation anzubinden. Die Kombination aus COBAS® AmpliPrep und COBAS® TaqMan® ermöglicht einen Durchsatz von bis zu 192 Proben pro Tag. Es können bis zu vier Parameter gleichzeitig bearbeitet werden. Die Systemsteuerung und Labor-EDV-Anbindung übernimmt die zentrale AMPLILINK-Software. Für alle Roche PCR-Systeme ist außerdem durch Teleservice eine schnelle Online-Hilfe möglich.

COBAS® AmpliPrep

Die vollautomatisierte Probenvorbereitung für die Routine-PCR

Der COBAS® AmpliPrep ist ein vollautomatisches Probenvorbereitungssystem für die Nukleinsäureaufreinigung aus klinischen Materialien. Die manuelle Arbeit bei der Probenvorbereitung beschränkt sich auf das Laden der Proben, Reagenzien und Einwegartikel. Alle weiteren Schritte laufen vollautomatisiert ab. Der COBAS® AmpliPrep ist mit dem COBAS® Amplicor® oder dem COBAS® TaqMan® kombinierbar. Der COBAS® AmpliPrep kann mit drei barcodierten Probenracks á 24 Proben beladen werden und ist kontinuierlich nachladbar. Es können bis zu vier verschiedene Parameter gleichzeitig in einem Lauf abgearbeitet werden.

Kontakt: info@roche.com
www.roche.de



Bayer HealthCare

Versant 440 - Komplett bDNA Automation

Der Versant 440 von Bayer HealthCare ist ein echtes „Walk away“ System für die zuverlässige Quantifizierung viraler Nukleinsäuren im Plasma oder Serum. Die automatisierte Reagenzzugabe eliminiert Pipettierschritte und optimiert damit den Ablauf im Labor. Der Start der Viruslastmessung kann zu jeder Tageszeit oder auch am Wochenende bei minimaler Personalbindung erfolgen.

Die zugrunde liegende bDNA Technologie erspart eine aufwendige Probenaufarbeitung und Nukleinsäureextraktion und das Risiko von Kontaminationen, die oft bei PCR basierenden Methoden auftreten. Mit bewährter Qualität liefert das System zuverlässig und reproduzierbar akkurate und präzise Ergebnisse zur Bestimmung der HIV, HCV und HBV Viruslast.



Kontakt:
stefan.wuerden@bayerhealthcare.com
www.bayerdiagnostika.de

Produktvergleich

Verschiedene Wege zum selben Ziel

Molekulargenetische Nachweisverfahren zur Bestimmung von Viren und Bakterien haben sich mittlerweile fest in der Routinediagnostik etabliert. Das Ziel ist dabei stets, einige wenige DNA- oder RNA-Moleküle mit größter Empfindlichkeit zu erfassen, ohne falsch-positive Ergebnisse zu produzieren.

Lässt sich z.B. ein Gesunder auf HIV testen, so kann ein falsch-positives Ergebnis eine Krise im Leben des Betroffenen auslösen. Bei der Testung von Blutproben müssen dagegen falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen werden, da sie das Leben des Empfängers kosten können. Die Anforderungen an Sensitivität und Spezifität hängen somit vom Einsatzbereich ab, sind aber in jedem Fall enorm hoch. Die Testsysteme hierfür basieren auf ganz unterschiedlichen Verfahren.

Die klassische Methode ist die PCR. Sie erlaubt einen qualitativen und mit Einschränkung auch quantitativen Nachweis. Eine Variante, die Real Time PCR, ermöglicht die Detektion bereits während der Amplifikation und ist optimal für quantitative Bestimmungen geeignet. Ein Beispiel für diese quantitative Echtzeitanalyse ist das TaqMan® Prinzip: Zusätzlich zu den PCR-Sonden bindet hier eine TaqMan® Probe, die neben einem Fluoreszenzfarbstoff auch ein Quencher-Molekül enthält, an der Ziel-DNA. Nach erfolgter Hybridisierung entfernt die Polymerase den Quencher, und das Fragment emittiert Fluoreszenzlicht.

Im Gegensatz zur PCR, die periodische Temperaturzyklen benötigt, läuft die SDA bei konstanter Temperatur ab. Auch hier findet die Amplifikation und Detektion gleich-

zeitig statt, der Prozess ist allerdings etwas komplexer als bei der RT-PCR. Ausgehend von spezifischen Sonden synthetisiert eine Polymerase zunächst einen DNA-Strang. Die Sonden enthalten eine Schnittstelle für ein Enzym, das einen Einzelstrangbruch auslöst. Eine weitere Polymerase setzt dann an der Schnittstelle an, verdrängt das alte und synthetisiert ein neues Fragment. Die Amplifikation erfolgt durch Wiederholung der Reaktionsschritte. Für die SDA sind in Kürze auch Tests zum Erregernachweis der atypischen Pneumonie verfügbar.

Ähnlich wie die SDA läuft auch die TMA bei konstanter Temperatur ab. Aufgrund der hohen Sensitivität eignet sich diese Methode besonders zum qualitativen HCV-Nachweis.

Bei der bDNA Technologie schließlich erfolgt die Detektion über eine Signalamplifikation. Spezifische Sonden hybridisieren mit den über Fangsonden fixierten Ziel-RNA-Molekülen. Neben der RNA-spezifischen Sequenz enthalten diese zweiten Sonden baumartige DNA-Strukturen (branched DNA) mit mehreren Bindungsstellen für Farbstoffe. Mehrfach gebundene Signalmoleküle rufen so eine Signalverstärkung hervor. ■

OS

Die nebenstehende Tabelle gibt einen Überblick über klinische Routinetest ohne Anspruch auf Vollständigkeit. So ist z.B. mit dem COBAS® AMPLICOR® auch ein quantitativer CMV-Test mit manueller Probenvorbereitung möglich, und mit dem Amplifikat aus der qualitativen HCV-PCR ist zusätzlich ein LinearArray-Test für die Hepatitis-C-Genotypisierung verfügbar.

Abbott



m2000rt

Bayer



Versant 440

BD Diagnostics



ProbeTec

Roche



COBAS® AMPLICOR®

COBAS® TaqMan® 48



ABBOTT RealTime m2000rt

Das neue m2000rt Real-Time-PCR-System ist ein gemäß GMP hergestelltes Gerät für die Amplifikation und Detektion von Nucleinsäuren unter Verwendung diagnostischer Assays. Die Software ermöglicht die benutzerfreundliche, schnelle und zuverlässige Ausgabe von Patientenergebnissen bezüglich der HIV- und HCV-Viruslast. Unmittelbar nach Abschluss der PCR sind quantitative Ergebnisse zusammen mit einem vollständigen Patientenergebnisbericht verfügbar. Das Gerät verwendet PCR-Platten

mit 96 Vertiefungen, die ein einfaches Pipettieren und gleichzeitig einen flexiblen und hohen Durchsatz ermöglichen. Diese Real-Time-Plattform bietet in Kombination mit den ABBOTT RealTime HIV und HCV Assays eine bedeutende Zeitersparnis, erhöhte Sensitivität, erstklassige Präzision und einen erweiterten dynamischen Messbereich. Die RealTime PCR Assays für HIV und HCV sind in Kombination mit dem Nucleinsäureextraktionssystem m1000 gemäß der In-vitro-Diagnostik-Direktive, IVDD, CE-zertifiziert.



Abbott Molecular Diagnostics

Hubertus.Reuter@abbott.com
www.abbott.com

Roche Diagnostics										
BD Diagnostics										
Bayer Diagnostics										
Abbott Molecular Diagnostics										
System	m2000rt	Versant 440 / TMA ⁵			ProbeTec	COBAS [®] AMPLICOR [®]		COBAS [®] TaqMan [®] 48		COBAS [®] TaqMan [®]
Amplifikationstechnik	Real Time PCR	bDNA / TMA			SDA	PCR		Real Time PCR		Real Time PCR
Chlamydia trachomatis (Probenvorbereitung ¹)	a	m			a / m	m		m		
analytische Sensitivität ² 95% Nachweisgrenze	System in Vorbereitung				35 EK < 1 EBE	1 IFU 5 Kopien		0,003 IFU		
klinische Spezifität (Abstrich /Urin Frauen in %) (Abstrich /Urin Männer in %)	verfügbar ab Q4 2005				98,1 / 98,4 94,2 / 91,4	98,3 95		100 100		
Testdauer inkl. Aufarbeitung (h / Best.)					2,5 / 94	5,5 / 24		3,5 / 48		
Neisseria gonorrhoeae (Probenvorbereitung ¹)	a	m			a / m	m				
analytische Sensitivität ² 95% Nachweisgrenze	System in Vorbereitung				10 CFU	5 Kopien				
klinische Spezifität (Abstrich /Urin Frauen in %) (Abstrich /Urin Männer in %)	verfügbar ab Q4 2005				99,5 / 99,4 97,9 / 97,9	96,3 100				
Testdauer inkl. Aufarbeitung (h / Best.)					2,5 / 94	5,5 / 24				
Mycobacterium tuberculosis (Probenvorbereitung ¹)					m	m				
analytische Sensitivität ² 95% Nachweisgrenze					9 CFU	40 CFU 5 Kopien				
klinische Spezifität (in %)					97,8	100				
Testdauer inkl. Aufarbeitung (h / Best.)					4 / 94	6,5 / 24				
HBV-quantitativ (Probenvorbereitung ¹)	a	m			a	m		a	m	a
analytische Sensitivität ³ 95% Nachweisgrenze	System in Vorbereitung				357	60		12	5,9	12
klinische Spezifität (in %)	verfügbar ab Q1 2006				98,6	100		100	100	100
linearer Messbereich (von-bis in IE/ml (Kopien/ml))					360-2x10 ⁷ (2.000-10 ⁸)	60-3,8x10 ⁴		54,5- 1,1x10 ⁸	29-1,1x10 ⁸	54,5-1,1x10 ⁸
Testdauer inkl. Aufarbeitung (h / Best.)					16 / 12 - 84	8 / 24		6 / 48	4 / 48	6 / 48
HCV-qualitativ (Probenvorbereitung ¹)					m	a		m		
analytische Sensitivität ³ 95% Nachweisgrenze					5-10 (genotypabhängig)	20-100 (genotyp- abhängig)		50 (Plasma) 60 (Serum)		
klinische Spezifität (in %)					>99	100		100		
Testdauer inkl. Aufarbeitung					5 / 100	8 / 24		5,5 / 24		
HCV-quantitativ (Probenvorbereitung ¹)	a (alle Ge- notypen)	m (ca. 09/05)			a	m		a	m ⁶	a
analytische Sensitivität ³ 95% Nachweisgrenze	12	12			615	600		15	10	15
klinische Spezifität (in %)	>99	>99			98,6	100		100	100	100
linearer Messbereich (von-bis in IE/ml (bzw. Kopien/ml))	12-1x10 ⁸	12-1x10 ⁸			600-8x10 ⁶ (3.200-10 ⁷)	600-7x10 ⁵		43-6,9x10 ⁷	30-2x10 ⁸	43-6,9x10 ⁷
Testdauer inkl. Aufarbeitung (h / Best.)	6 / 48	6 / 24			16 / 12 - 84	7,5 / 24		6,5 / 48	5,75 / 48	6,5 / 48
HIV-quantitativ (Probenvorbereitung ¹)	a	m (ca. 09/05)			a	m		a	m	a
analytische Sensitivität ⁴ 95% Nachweisgrenze	40	40				50 US 400 ST		50 US 400 ST	40	40
klinische Spezifität (in %)	>99	>99			96,1	100		99,8 US 100 ST	100	100
linearer Messbereich (in Kopien/ml)	40-1x10 ⁷	40-1x10 ⁷			50-5x10 ⁵	50-1x10 ⁵ US 400-1x10 ⁶ ST		50-1x10 ⁵ US 400-7,5 x10 ⁶ ST	40-1x10 ⁷	40-1x10 ⁷
Testdauer inkl. Aufarbeitung (h / Best.)	6 / 48	6 / 24			20 / 12 - 84	20 / 12 - 84		8 / 24	7,5 / 24	7 / 48

Abkürzungen

CFU: colony forming unit
 EBE: Einschluss-bildende Einheit
 EK: Einschlusskörper (Maß für die Stärke einer Chlamydieninfektion)
 IE: Internationale Einheiten
 IFU: inclusion forming unit (Infektionsdosis von Chlamydien)
 ST: Standard-Verfahren
 US: UltraSensitive-Verfahren

Fußnoten

- 1 a = automatisch
m = manuell
- 2 pro PCR-Reaktion
- 3 in IE/ml
- 4 in Kopien/ml
- 5 HCV quantitativ auf Versant TMA, alle übrigen Tests auf Versant 440
- 6 Test kann für Genotyp 1 und 6 verwendet werden