

Ideen aus der Hippiezeit

Mit der *Polymerase Chain Reaction* (PCR, Polymerase-Kettenreaktion) gelang dem Nobelpreisträger Kary Mullis vor exakt 30 Jahren ein Durchbruch mit weitreichenden Folgen für die Medizin: die direkte Vermehrung genetischen Materials unter Umgehung der natürlichen Befruchtung und Zellteilung. Die Idee wurde zwar bereits 1970 im Labor des Nobelpreisträgers Har G. Khorana geboren, der das erste künstliche Gen im Reagenzglas herstellte. Aber Mullis schaffte es, mithilfe eines zyklischen Prozesses große Mengen identischer Gensequenzen zu erzeugen. Nur so kann man beispielsweise einige wenige HI-Viren im Blut nachweisen.

Um Kary Mullis ranken sich Legenden, die uns ganz nebenbei einen Eindruck von der damals unter Intellektuellen weit verbreiteten Hippie-Gedankenwelt vermitteln. In einem lesenswerten Assay beschreibt Mullis seine Erfahrungen mit der beachtlichen Dosis von 1 mg LSD¹; er war davon überzeugt, dass er die PCR ohne diese Droge nie entdeckt hätte. Angeblich kam ihm der Gedanke beim Rangieren mit seinem Auto: Je öfter er vor- und zurücksetzte, desto mehr Doppelspuren – als Analogie zur DNA-Doppelhelix – zeichneten die Reifen in den Staub. Zu seiner Gedankenwelt gehörte allerdings auch, dass er die Existenz des Ozonlochs und den Zusammenhang zwischen HIV-Infektion und AIDS bezweifelte.

Bei aller Bewunderung für die Pionierleistung von Mullis bleibt festzuhalten, dass die Natur zahllose Stoffwechselwege entwickelt hat, um Nucleinsäuren zu vermehren, und viele davon sind heute als alternative Testverfahren im Einsatz. Der durchschlagende Erfolg der PCR ist wohl nicht zuletzt der Finanzkraft des Patentinhabers Hoffmann La Roche geschuldet.

gh

¹csp.org/chrestomathy/dancing_naked.htm



Nucleinsäurediagnostik im mikrobiologischen Labor

Wunderbarer Wildwuchs

Bild: © Anja Bach

Nucleinsäure-basierte Erregernachweise haben die mikrobiologische Routinediagnostik auf breiter Front erobert. Noch konkurrieren zahlreiche Extraktions-, Amplifikations- und Detektionsverfahren um die Gunst der Anwender. Die Auswahl der Methoden ist herausfordernd und zugleich inspirierend.

Als Goldstandard setzt die medizinische Mikrobiologie bei der Identifizierung pathogener Mikroorganismen traditionell auf die kulturelle Vermehrung mit nachfolgender phänotypischer Charakterisierung. Doch dieses Vorgehen eignet sich naturgemäß nicht für den Nachweis von Erregern, die sehr langsam wachsen, nicht kultivierbar sind oder aus Probenmaterial von antibiotisch vorbehandelten Patienten stammen.

Diese Grenzen der klassischen Mikrobiologie dürften den derzeitigen Siegeszug der genotypischen Charakterisierung zumindest teilweise erklären. Nucleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT) gelten heute in der Virologie bereits als der eigentliche „Goldstandard“ und gewinnen auch beim Direktnachweis und der Charakterisierung von Bakterien, Pilzen und Parasiten beeindruckend schnell an Bedeutung.

Universell einsetzbar

Der größte Vorteil aller Nucleinsäure-gestützten Verfahren liegt in ihrer universellen Anwendbarkeit: DNA bzw. RNA können zur direkten Identifizierung aller bekannten Mikroorganismen herangezogen werden, unabhängig von der erfolgreichen

Anzucht, den phänotypischen Merkmalen oder einer Immunantwort des Patienten. Umgekehrt darf nicht verschwiegen werden, dass sich die gewählten Zielsequenzen durch Mutationen ändern und so zu falsch negativen Ergebnissen führen können; betroffen sind hier vor allem rasch mutierende Viren, aber auch Chlamydien oder Gonokokken.

Der Einsatz von NAT löst auch das Zeitproblem aller kulturellen Verfahren: Eine klassische Spezies-ID mit Resistenztestung benötigt mindestens zwölf Stunden, für die *Aspergillus*-Anzucht sind drei Tage und für den kulturellen Nachweis von *M. tuberculosis* sogar über drei Wochen anzusetzen. Dem steht ein mittlerer Zeitbedarf von etwa drei Stunden für die gebräuchlichen NAT-Verfahren gegenüber. Nur der direkte Bakteriennachweis mittels Gramfärbung ist mit rund 30 Minuten noch schneller, liefert aber nur selten genauere Speziesinformationen.

Was kulturelle Verfahren gegenüber NAT ganz unbestritten auszeichnet, ist die einfache technische Durchführung, denn Keime wachsen unter geeigneten Bedingungen mehr oder weniger von allein. Im Gegensatz dazu erfordern alle molekular-diagnostischen Nachweise ein mehrstufiges

Protokoll, das – zumindest bei manueller Abarbeitung – hohen Aufwand an Personal, Zeit und Platzbedarf mit sich bringt. Unabhängig vom nachzuweisenden Erreger folgt die praktische Durchführung stets dem gleichen Prinzip: Die Nukleinsäure muss zuerst aus dem Untersuchungsmaterial extrahiert werden; anschließend vermehrt man bestimmte Genomabschnitte *in vitro*, detektiert die Amplifikate und sichert die Qualität der Ergebnisse.

Probenvorbereitung

In den letzten 15 Jahren lag der Schwerpunkt der Entwicklung bei immer besseren Amplifikations- und Nachweisverfahren. Die weniger spektakuläre Probenvorbereitung aber, die einen ebenso großen Beitrag zur analytischen Qualität leistet, steht erst seit kurzem im Fokus des Interesses bei Anwendern und Herstellern.

Für Viren, Bakterien, Pilze, Sporen und Parasiten ist der erste Arbeitsschritt die möglichst effiziente Lyse der Zielorganismen. Abhängig von Konsistenz und Zusammensetzung des Probenmaterials kommen unterschiedlichste Aufschlussverfahren zum Einsatz; ihr Spektrum reicht von mechanischen (Ultraschall, Zelmühle) über chemische (Phenol/Chloroform, chaotrope Salze) bis zu enzymatischen

Methoden (Proteinase K, Lysozym, Zymolase). Anschließend wird die Nukleinsäure unspezifisch oder spezifisch (Silikate, Fangsonden) an eine feste Phase gebunden, gewaschen und eluiert.

Universalkits gibt es nicht

Im manuellen Betrieb sind hierfür Silikasäulchen weit verbreitet, die mit einer normalen Laborzentrifuge prozessiert werden können. Für automatisierte Systeme gibt es dagegen eine kaum überschaubare Auswahl an Kits, Röhrchen, Kassetten, Pouches usw., die auf bestimmte Erregergruppen, Probenmaterialien und Extraktionsautomaten abgestimmt sind. So wünschenswert auch die Entwicklung eines universellen Extraktionskits für alle Pathogene sein mag, so unmöglich erscheint dies angesichts der Vielfalt erreger- und materialspezifischer Eigenheiten.

Deshalb ist auch der in der Überschrift thematisierte „wunderbare Wildwuchs“ konkurrierender Verfahren – sprich die mangelnde Standardisierung – durchaus positiv gemeint. Auf diese Weise bleibt der Markt nicht nur attraktiv für innovative Entwicklungen der Industrie, sondern lässt auch den Anwendern noch genügend Raum, Expertise bei der Auswahl und Kombination der geeignetsten Methoden

zu erwerben. Die Präanalytik bestimmt ganz wesentlich Ausbeute und Qualität der gewonnenen Nukleinsäure und damit die analytische Sensitivität der nachfolgenden Amplifikation und Detektion. Und wer glaubt, hier sei dank der allumfassenden Präsenz der *Real-Time* PCR Schluss mit der methodischen Vielfalt, der irrt.

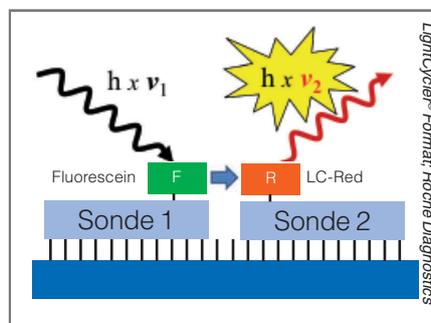
Amplifikationstechniken

Richtig ist allerdings, dass die von Kary Mullis erfundene und von den späteren Patentinhabern weiterentwickelte PCR nach wie vor die höchste Popularität genießt. Ihr Prinzip ist genial einfach: Der DNA-Doppelstrang (*template*) wird durch Erhitzung in die beiden Einzelstränge aufgetrennt; anschließend hybridisieren zwei definierte Oligonukleotide (*primer*) bei erniedrigter Temperatur an die jeweils komplementären Stellen dieser Stränge (*annealing*); schließlich verlängert ein Enzym (*DNA-Polymerase*) mithilfe von Nukleotidbausteinen (A, C, G, T) die gebundenen Primer so, dass wieder zwei Doppelstränge entstehen. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt, bis genügend DNA für die Analyse vorliegt.

Die mittlere Abbildung zeigt eine von vielen Varianten der *Real-Time* PCR; dabei binden zusätzlich zu den Primern zwei mit



Der Autor mit Nobelpreisträger Prof. Kary Mullis (links) beim Internationalen qPCR-Meeting 2009 in Weihenstephan (www.trillium.de/fileadmin/pdf_archiv_2009/S127-135_3_2009_MM.pdf).



Real-Time PCR: Wenn sich die beiden FRET-Sonden nähern („Kissing Probes“), wird Energie übertragen und Fluoreszenzlicht spezifischer Wellenlänge vom Akzeptor-Farbstoff emittiert.



Qualitätskontrolle per Schmelzkurvenanalyse: Hier fallen irreguläre und grenzwertige Kurvenverläufe auf (z. B. im Falle der Präsenz verwandter, aber nicht identischer Keime).

Bilder mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. U. Reischl (links und Mitte) und Dr. T. Hoff (rechts).

Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonden direkt nebeneinander an die Amplifikate. Das abgestrahlte Licht erlaubt es, den zyklischen Vorgang in Echtzeit zu beobachten und so beispielsweise quantitative DNA-Analysen durchzuführen (*qPCR*). Um auch RNA messen zu können, muss man diese vor der PCR in DNA „umschreiben“ (*reverse transcription PCR*).

Die Details der überaus zahlreich im Einsatz befindlichen PCR-Varianten würden den Rahmen dieser kurzen Einführung sprengen, und umso mehr gilt das für die vielen alternativen Verfahren zur Nukleinsäure- oder Signalamplifikation, zum Beispiel bDNA, LCR, NASBA, SDA oder TMA. Wie bei der Präanalytik ist es auch bei der eigentlichen Analytik angebracht, von „Wildwuchs“ im positivsten Sinn des Wortes zu sprechen. Die PCR deckt inzwischen zwar viele Bereiche der molekularen Diagnostik hervorragend ab, doch auch die alternativen Verfahren haben ihre Vorzüge; zum Beispiel können sie bei bestimmten Fragestellungen schneller und praktikabler, sensitiver oder spezifischer sein.

Viele dieser Methoden wurden wohl eher aus patentrechtlichen und ökonomischen Erwägungen, als aus der sachlichen Notwendigkeit heraus entwickelt. Aber auch wenn die letzten grundlegenden *Real-Time PCR*-Patente 2016 auslaufen, wird die inspirierende Vielfalt der NAT-Verfahren mit Sicherheit erhalten bleiben – im Sinne einer immer besseren Diagnostik. 🌸



Prof. Dr. rer. nat. Udo Reischl
 Universitätsklinikum Regensburg (UKR)
 Inst. für Med. Mikrobiologie und Hygiene
 udo.reischl@ukr.de

Modulare NAT-Automation im Krankenhauslabor

Am Klinikverbund Bremen sind Nukleinsäure-Amplifikationstests für den Mutations- und Erregernachweis fest etabliert. Seit Jahren – und forciert durch Todesfälle auf der Frühgeborenenstation am Klinikum Bremen-Mitte – wird die PCR in unseren Labors insbesondere für das risikoadaptierte MRSA-Screening nach den Vorgaben des RKI durchgeführt. Der Nukleinsäurenachweis verkürzt die Antwortzeiten im Vergleich zur Kultur von zwei bis drei Tagen auf drei bis vier Stunden.

Auch bei geringen bis mittleren Probendurchsätzen unter etwa 100 pro Woche lohnt sich die Automatisierung von Teilschritten. Die einfachste Form ist die Online-Anbindung an das Laborinformationssystem. So können die PCR-Ergebnisse fehlerfrei übermittelt und dokumentiert werden. Die eigentliche Automatisierung setzt bei der Nuklein-

säure-Extraktion, dem Pipettieren der Reaktionsansätze sowie dem qualitativen oder quantitativen Nachweis der Amplifikate an.

Ihre Vorteile sind verminderte Kontaminationsgefahr durch manuelle Verschleppung, Platzgewinn durch Verzicht auf das Dreiraumprinzip sowie Freisetzung von qualifiziertem Personal für höherwertige Aufgaben. So können individuelle ökonomische und organisatorische Herausforderungen flexibel und gar qualitätssteigernd gemeistert werden.



Dr. rer. nat. Torsten Hoff, GESUNDHEIT NORD
 torsten.hoff@klinikum-bremen-nord.de

Vollautomation für ein breites Anwendungsspektrum

Interessanterweise beobachten wir derzeit in zwei sehr gegensätzlichen Marktsegmenten einen Trend zur Vollautomation von Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken: Große Einsendelaboratorien nutzen integrierte Systeme für den Hochdurchsatz in der Infektionsdiagnostik und Genetik sowie als Amplifikationsmaschinerie für Downstream-Applikationen wie Sequenzierung und Hybridisierung. Hier sehen wir eine völlige Verschmelzung von ehemals separaten Einzelmodulen zu „Straßen“, aus denen alle manuellen Schritte kontinuierlich verbannt werden.

Am entgegengesetzten Ende der Skala steht die vollautomatische Abarbeitung von Einzelproben in der patientennahen Diagnostik, wobei geschlossene Kassetten und andere Behälter sämtliche Reaktionsselemente – vom Probenaufschluss bis zur Detektion – enthalten. Ihre Haupteinsatzgebiete sind mikrobiologische Eilanalysen, deren Ergebnisse aus medi-

zinen oder ökonomischen Gründen sofort vorliegen müssen (zum Beispiel Herpes simplex, MRSA, *C. difficile*). Auch für die Onkologie und Humangenetik sind bereits POCT-Tests erhältlich.

Das Marktsegment zwischen den beiden Extremen wird wohl von beiden Seiten her durch Vollautomationssysteme erschlossen werden. Für die Firmen interessant ist ja vor allem der Verkauf von Reagenzien. Viele Hersteller statten heute auch kleinere Labore im Rahmen von Reagenz-Leasing-Verträgen mit Vollautomaten aus, sofern mehr als etwa 100 Hepatitis-, HIV- oder CT-Proben pro Woche anfallen.



Dr. rer. nat. Peter Gohl, BIOSCIENTIA
 peter.gohl@bioscientia.de