

# ***Nukleinsäurediagnostik im mikrobiologischen Labor***

***Neue Möglichkeiten des kulturunabhängigen  
Erregernachweises, der Speziesdifferenzierung  
und molekularen Resistenztestung***

Prof. Dr. Udo Reischl  
Olfert Landt  
Prof. Dr. Holger F. Rabenau  
Dr. Walter Geißdörfer



# **Nukleinsäure- diagnostik im mikro- biologischen Labor**

**Neue Möglichkeiten des kulturunabhängigen  
Erregernachweises, der Speziesdifferenzierung  
und molekularen Resistenztestung**



**UNI-MED Verlag AG**  
**Bremen - London - Boston**

**Reischl, Udo:**

Nukleinsäurediagnostik im mikrobiologischen Labor – Neue Möglichkeiten des kulturunabhängigen Erregernachweises, der Speziesdifferenzierung und molekularen Resistenztestung/Udo Reischl.-  
1. Auflage - Bremen: UNI-MED, 2012, ISBN 978-3-8374-6254-8

© 2012 by UNI-MED Verlag AG, D-28323 Bremen,  
International Medical Publishers (London, Boston)  
Internet: [www.uni-med.de](http://www.uni-med.de), e-mail: [info@uni-med.de](mailto:info@uni-med.de)

Printed in Germany

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle dadurch begründeten Rechte, insbesondere des Nachdrucks, der Entnahme von Abbildungen, der Übersetzung sowie der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Weg bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Die Erkenntnisse der Medizin unterliegen einem ständigen Wandel durch Forschung und klinische Erfahrungen. Die Autoren dieses Werkes haben große Sorgfalt darauf verwendet, dass die gemachten Angaben dem derzeitigen Wissensstand entsprechen. Das entbindet den Benutzer aber nicht von der Verpflichtung, seine Diagnostik und Therapie in eigener Verantwortung zu bestimmen.

Geschützte Warennamen (Warenzeichen) werden nicht besonders kenntlich gemacht. Aus dem Fehlen eines solchen Hinweises kann also nicht geschlossen werden, dass es sich um einen freien Warennamen handele.

## ***UNI-MED. Die beste Medizin.***

---

In der Reihe UNI-MED SCIENCE werden aktuelle Forschungsergebnisse zur Diagnostik und Therapie wichtiger Erkrankungen "state of the art" dargestellt. Die Publikationen zeichnen sich durch höchste wissenschaftliche Kompetenz und anspruchsvolle Präsentation aus. Die Autoren sind Meinungsbildner auf ihren Fachgebieten.

# Vorwort

---

Traditionell beruht der Nachweis von pathogenen Bakterien und Pilzen aber auch von Viren auf deren (zell)kultureller Vermehrung und anschließender Differenzierung. Mit der Verfügbarkeit von Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren und Methoden zur sequenzspezifischen Charakterisierung der Amplifikationsprodukte eröffnen sich jedoch Möglichkeiten für eine kulturunabhängige Erregeridentifizierung.

Der Begriff "Nukleinsäure-Amplifikationstechniken" (NAT) umfasst mittlerweile ein breites Spektrum unterschiedlicher molekularbiologischer Methoden, die alle für den gezielten Nachweis von kleinsten Mengen an Nukleinsäuren (DNA oder RNA) entwickelt wurden. In vielen Bereichen der modernen mikrobiologischen Diagnostik erweist sich der Einsatz dieser enorm sensitiven, spezifischen und zumeist auch sehr schnellen Testsysteme bereits als ideale Ergänzung zu konventionellen Untersuchungsverfahren wie Mikroskopie und Kultur.

Sowohl die ständig zunehmende Zahl von pathogenen Erregern (*emerging diseases*), die Fortschritte bei der Aufklärung von komplexen Pathogenitätsmechanismen, aber auch die Verbesserung der antibiotischen und antiviralen Medikation zur gezielten Behandlung von Infektionserkrankungen fordern eine adäquate infektiologische Diagnostik. Unter Ausnützung des hohen diagnostischen Potentials der Nukleinsäure-gestützten Testsysteme wurden und werden in enger Zusammenarbeit von Klinikern, Mikrobiologen und Molekularbiologen eine Reihe von maßgeschneiderten Anwendungsverfahren entwickelt, die dazu beitragen, die ständig steigenden Anforderungen an die mikrobiologische Diagnostik zu erfüllen.

Auch wenn die Festlegung von klinischen Indikationen für die Durchführung von erregerspezifischen NAT-Untersuchungen in vielen Bereichen z.T. noch weiterer Erfahrung bedarf, sind für den gezielten Nachweis von nahezu allen bakteriellen, viralen, fungalen oder anderen eukaryonten Pathogenen bereits eine Reihe kommerzieller Testsysteme und sehr zahlreiche selbst entwickelte (*in house*) Protokolle verfügbar. Nicht zuletzt aufgrund der universellen Natur von Nukleinsäuren und der Verfahren zu ihrem Nachweis möchten wir bereits Eingangs darauf hinweisen, dass der Begriff "Medizinische Mikrobiologie" im vorliegenden Buch disziplinübergreifend verwendet wird und synonym für die oftmals noch getrennt betrachteten Fachbereiche der diagnostischen Virologie, Bakteriologie und Parasitologie, sowie der Pilzdiagnostik und dem Nachweis eukaryonter Pathogene steht.

Obwohl in der deutschsprachigen Fachliteratur regelmäßig eine Reihe von hochqualifizierten Beiträgen zu spezifischen diagnostischen Fragestellungen im Bereich der Nukleinsäurediagnostik erscheinen, ist ein gewisser Mangel an umfassenden und vor allem aktuellen Übersichtsarbeiten nicht von der Hand zu weisen. In der vorliegenden Arbeit wird daher versucht, die methodischen Grundlagen von "altbewährten", von modernen, aber auch von zukünftigen Nukleinsäure-gestützten Testsystemen in didaktischer Reihenfolge darzustellen. Damit sind an bestimmten Stellen und in manchen Kapiteln des vorliegenden Buches Redundanzen nicht ganz zu vermeiden, die bei der Lektüre hoffentlich nicht als störend empfunden werden. Nach einer detaillierten Beschreibung der molekularbiologischen Arbeitsschritte, von der Nukleinsäure-Isolierung, Amplifikation bis zur Detektion werden anhand einiger repräsentativer Beispiele aus der medizinischen Mikrobiologie sowohl das Potenzial als auch die Limitationen von NAT-gestützten diagnostischen Verfahren dargestellt.

Aufgrund der enormen Vielfalt erregerspezifischer NAT-Protokolle soll (und kann) dieses Buch auch nur das derzeit machbare, d.h. den Stand der Technik aufzeigen. Inwieweit die geschilderten Methoden und Untersuchungsverfahren im Einzelfall auch diagnostisch und ökonomisch sinnvoll sind, kann nur vom jeweiligen Laborleiter individuell beurteilt werden. Die im folgenden exemplarisch aufgezeigten Vor- und Nachteile einzelner manueller oder automatisierter Nachweisverfahren können diesen Entscheidungsprozess jedoch eventuell erleichtern. Darüber hinaus liegt es ausdrücklich nicht im Sinne der Autoren, die

Verwendung von Nukleinsäurediagnostik generell zu "beweihräuchern" und auf diese Weise den unkontrollierten Einsatz dieser kostenintensiven Testsysteme zu fördern.

So wird der Stellenwert vieler konventioneller, mikrobiologischer Methoden weiterhin erhalten bleiben, denn die Serologie ist im Umfeld der Virusdiagnostik nicht wegzudenken und eine Kultur auf geeigneten Nährmedien ist für den Nachweis der meisten bakteriellen und fungalen Erreger eine schnelle, billige und sensitive Methode und erlaubt darüber hinaus eine gezielte Sensibilitätstestung gegenüber Antibiotika, die mittels Nukleinsäureanalyse derzeit nur sehr aufwendig oder noch gar nicht durchzuführen ist. Andererseits sollten Vorbehalte gegenüber molekularbiologischen Verfahren abgebaut werden und nach sorgfältiger Kosten/Nutzen-Analyse, einer Validierung der einzelnen Protokolle im Rahmen klinischer Studien, und damit einer genaueren Eingrenzung der potentiellen Indikationsgebiete, zu deren gezieltem Einsatz, natürlich immer zum Wohle der Patienten, aufgerufen werden. Vor der Entscheidung, eine PCR-Untersuchung anzufordern, sollte stets eine genaue Abwägung zwischen der erzielbaren bzw. erforderlichen Schnelligkeit, Sensitivität und Spezifität des Erregernachweises und deren Aussagepotenzial im Vergleich mit den bewährten konventionellen Testsystemen erfolgen. Um solche patientenorientierten Kosten-Nutzen Abwägungen qualifiziert durchführen und die entsprechenden Befunde auch richtig interpretieren und umsetzen zu können, sollte natürlich auch der behandelnde Arzt so gut wie möglich mit den enormen Möglichkeiten aber auch den methodischen Grenzen von nukleinsäurediagnostischen Verfahren vertraut sein.

Nach mehr als eineinhalb Jahrzehnten intensiver Forschungs- und Entwicklungsarbeit an der eigentlichen Methodik sowie der Etablierung und Standardisierung individueller Testsysteme sind Nukleinsäure-gestützte Verfahren bereits bei einigen diagnostischen Fragestellungen als "Goldstandard" etabliert. Auch in Zeiten zunehmend enger werdender Budgets müssen neue Verfahren noch in das Repertoire diagnostischer Laboratorien Einzug finden können, die erwiesenermaßen dazu geeignet sind, Patientenschicksale positiv zu beeinflussen.

Auch wenn in unserem gemeinsam verfassten Buch der Fokus der Ausführungen etwas auf den molekularbiologischen Nachweis von Bakterien und Pilzen gerichtet ist, wurden die Viren nicht ausgelassen. Für vertiefende Informationen sei an dieser Stelle auf entsprechende Sach- und Lehrbücher verwiesen (u.a. Doerr und Gerlich, 2010; Mackay, 2007; Preiser et al., 2002; Rabenau and Berger, 2006).

Wir sind bei diesem Buchprojekt mit dem Ziel gestartet, nicht nur ein Lehrbuch, sondern auch ein Lesebuch über die komplexe Materie der modernen Nukleinsäurediagnostik zu verfassen. Über die möglichst verständliche und illustrative Darstellung der Grundlagen, Ausführungsformen aber auch der patientenorientierten Applikationen von Nukleinsäurediagnostik im Umfeld der medizinischen Mikrobiologie wollen wir aber zugleich auch erreichen, dass eine zunehmende Zahl von Kolleginnen und Kollegen unseren langjährigen Enthusiasmus für diese Technologie nachvollziehen kann und im Idealfall auch teilen wird. Hoffentlich konnten wir beide Ziele, zumindest in weiten Teilen, mit dem vorliegenden Buch erreichen.

Die wertvollen Rückmeldungen aus dem Kreis der geneigten Leser werden zweifellos dazu beitragen, die zweite Auflage dieses Werkes noch stärker an Ihren Wünschen und Bedürfnissen zu orientieren.

*Regensburg, Berlin, Frankfurt und Erlangen, im September 2012*

*U. Reischl,  
O. Landt,  
H.F. Rabenau,  
W. Geissdörfer*

Gewidmet Herrn Dr. Michael Herlt († 2010),  
einem hochgeschätzten Kollegen und lieben Freund.

Als einer der Pioniere bei der Etablierung von routinefähigen real-time-PCR-Testsystemen  
hat er den Baum gepflanzt, dessen Früchte wir jetzt ernten dürfen.

## Autoren

---

Prof. Dr. Udo Reischl  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Universitätsklinikum Regensburg  
Franz-Josef-Strauss Allee 11  
D-93053 Regensburg  
e-mail: udo.reischl@ukr.de

Olfert Landt  
TIB MOLBIOL GmbH  
Eresburgstraße 22-23  
D-12103 Berlin  
e-mail: olandt@tib-molbiol.de

Prof. Dr. Holger F. Rabenau  
Institut für Medizinische Virologie  
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Paul-Ehrlich-Straße 40  
D-60596 Frankfurt  
e-mail: Rabenau@em.uni-frankfurt.de

Dr. Walter Geißdörfer  
Universitätsklinikum Erlangen  
Mikrobiologisches Institut  
Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
Wasserturmstraße 3  
D-91054 Erlangen  
e-Mail: walter.geissdoerfer@uk-erlangen.de

# Inhaltsverzeichnis

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>13</b> |
| <b>2.</b> | <b>Techniken</b>  | <b>15</b> |
| 2.1.      | Nukleinsäure-Isolierung .....   | 15        |
| 2.2.      | Nukleinsäure-Direktnachweis .....   | 19        |
| 2.2.1.    | Nukleinsäure-Hybridisierung zum Direktnachweis von Erregern im Untersuchungsmaterial .....                    | 19        |
| 2.3.      | Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) .....  | 22        |
| 2.3.1.    | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....   | 22        |
| 2.3.2.    | <i>Nested</i> PCR .....   | 24        |
| 2.3.3.    | Reverse Transkriptase (RT)-PCR .....  | 25        |
| 2.3.4.    | Ligase-Kettenreaktion (LCR) .....   | 25        |
| 2.3.5.    | NASBA, 3SR, TMA und TAS .....   | 25        |
| 2.3.6.    | Strand Displacement Amplification (SDA) .....   | 27        |
| 2.3.7.    | Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) .....   | 28        |
| 2.4.      | Nachweis von spezifischen Amplifikationsprodukten .....   | 28        |
| 2.4.1.    | Qualitative oder quantitative Detektion? .....  | 29        |
| 2.5.      | <i>Real-time-PCR-Verfahren</i> .....  | 34        |
| 2.5.1.    | Detektionsverfahren mit Doppelstrang-spezifischen Farbstoffen (ohne Sonden) .....                             | 36        |
| 2.5.2.    | Sondenbasierte Verfahren .....  | 37        |
| 2.5.3.    | Hydrolyse (TaqMan)-Sonden und Molecular Beacons .....   | 37        |
| 2.5.4.    | Fluoreszenzmarkierte Primer .....   | 38        |
| 2.5.5.    | FRET-Hybridisierungssonden .....  | 39        |
| 2.5.6.    | Thermocycler für die <i>real-time-PCR</i> . .....   | 42        |
| 2.5.7.    | Diagnostische Fragestellungen .....   | 46        |
| 2.6.      | DNA-Sequenzierung .....   | 47        |
| 2.7.      | Next-Generation-Sequenzierung in der medizinischen Forschung .....  | 48        |
| <b>3.</b> | <b>Reaktionsparameter und diagnostischer Workflow</b>   | <b>52</b> |
| 3.1.      | Analytische Sensitivität von NAT-Nachweisverfahren .....  | 52        |
| 3.2.      | Analytische Spezifität von NAT-Nachweisverfahren .....  | 55        |
| 3.3.      | Diagnostische Sensitivität und Diagnostische Spezifität .....   | 57        |
| 3.4.      | Positiver und Negativer Prädiktionwert .....  | 57        |
| 3.5.      | Kriterien zur Evaluierung von eigenentwickelten NAT-Testsystemen .....  | 57        |
| 3.6.      | Präanalytik .....   | 70        |
| 3.7.      | Kontaminationsproblematik und Raumkonzept .....   | 71        |
| 3.8.      | Qualitätsmanagement und externe Qualitätskontrolle .....  | 74        |
| <b>4.</b> | <b>Beispiele aus der mikrobiologischen Praxis für PCR-gestützte Nachweisverfahren – bakterielle Nachweise</b> | <b>77</b> |
| 4.1.      | PCR-Verfahren zum Direktnachweis von Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) .....        | 77        |
| 4.2.      | Pathogene <i>Escherichia coli</i> (EHEC, EPEC u.a.) .....   | 85        |
| 4.2.1.    | EHEC .....  | 86        |
| 4.2.2.    | EPEC .....  | 88        |
| 4.3.      | <i>Borrelia burgdorferi</i> .....   | 88        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 4.4.      | <i>Tropheryma whipplei</i> .....   | 90         |
| 4.5.      | Bakterielle Erreger bei "atypischen" Pneumonien .....  | 92         |
| 4.6.      | <i>Chlamydia trachomatis</i> .....   | 93         |
| 4.7.      | Mykobakterien .....  | 95         |
| 4.7.1.    | Erreger und klinische Manifestation .....  | 95         |
| 4.7.2.    | Mikrobiologische Diagnostik .....  | 96         |
| 4.7.3.    | Mykobakterien-Nachweis mittels NAT in klinischen Proben .....  | 97         |
| 4.7.4.    | Molekularbiologische Methoden der Speziesidentifizierung .....   | 98         |
| 4.7.5.    | NAT-basierte Resistenztestung von <i>M. tuberculosis</i> -Komplex .....  | 99         |
| 4.8.      | <i>Toxoplasma gondii</i> .....   | 100        |
| 4.9.      | Leishmanien .....  | 102        |
| <b>5.</b> | <b>Beispiele aus der mikrobiologischen Praxis für PCR-gestützte Nachweisverfahren – virale Nachweise</b> ..... | <b>106</b> |
| 5.1.      | Molekulare Resistenztestung .....  | 106        |
| 5.2.      | Clarithromycin-Resistenz bei <i>Helicobacter pylori</i> .....  | 106        |
| <b>6.</b> | <b>Speziesübergreifende Nachweisverfahren – die Königsdisziplin?</b> .....                                     | <b>110</b> |
| 6.1.      | Kontaminationsproblematik .....  | 112        |
| 6.2.      | Microarrays zur Analyse von Mischpopulationen .....  | 113        |
| <b>7.</b> | <b>NAT in der Virusdiagnostik – Anwendungsbereich und geeignetes Untersuchungsmaterial</b> .....               | <b>115</b> |
| 7.1.      | Adenoviren .....   | 115        |
| 7.2.      | Bocavirus (BoV) .....  | 116        |
| 7.3.      | Coronaviren .....  | 116        |
| 7.4.      | Dengueviren .....  | 116        |
| 7.5.      | Enteroviren (Polio, Coxsackie, ECHO) .....   | 117        |
| 7.6.      | Epstein-Barr-Virus (EBV) .....   | 117        |
| 7.7.      | Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV) .....   | 118        |
| 7.8.      | Hantaviren .....   | 118        |
| 7.9.      | Hepatitis-A-Virus (HAV) .....  | 118        |
| 7.10.     | Hepatitis-B-Virus (HBV) .....  | 119        |
| 7.11.     | Hepatitis-C-Virus (HCV) .....  | 119        |
| 7.12.     | Hepatitis-D-Virus (HDV, Delta-Agens) .....   | 119        |
| 7.13.     | Hepatitis-E-Virus (HEV) .....  | 120        |
| 7.14.     | Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 (HSV-1, HSV-2) .....  | 120        |
| 7.15.     | Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6) .....  | 121        |
| 7.16.     | Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) – Kaposi-Sarkom-assoziiertes-Herpesvirus (KSHV) .....                            | 121        |
| 7.17.     | Humanes Immundefizienzvirus, Typ 1 und 2 (HIV-1, HIV-2) .....  | 122        |
| 7.18.     | Humanes Metapneumovirus (hMPV) .....   | 122        |
| 7.19.     | Influenzaviren .....   | 122        |
| 7.20.     | Masernvirus .....  | 123        |
| 7.21.     | Molluscum-contagiosum-Virus .....  | 123        |
| 7.22.     | Mumpsvirus .....   | 123        |
| 7.23.     | Norovirus .....  | 123        |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 7.24. | Papillomaviren (HPV) .....                       | 124 |
| 7.25. | Parainfluenzavirus Typen 1-4.....                | 124 |
| 7.26. | Parvovirus B19.....                              | 124 |
| 7.27. | Polyomaviren (JC- und BK-Virus [JCV, BKV]) ..... | 125 |
| 7.28. | Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) .....          | 125 |
| 7.29. | Rötelnvirus (Rubella).....                       | 126 |
| 7.30. | Rotaviren.....                                   | 126 |
| 7.31. | Varizella-Zoster-Virus (VZV) .....               | 126 |
| 7.32. | West-Nil-Virus (WNV) .....                       | 127 |
| 7.33. | Zytomegalievirus (CMV) .....                     | 127 |

|           |                  |            |
|-----------|------------------|------------|
| <b>8.</b> | <b>Literatur</b> | <b>128</b> |
|-----------|------------------|------------|

|  |              |            |
|--|--------------|------------|
|  | <b>Index</b> | <b>135</b> |
|--|--------------|------------|

# 1. Einleitung

Die medizinische Mikrobiologie beschäftigt sich traditionell mit der Isolierung und Identifizierung humanpathogener Mikroorganismen – das sind Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren.

Der mikroskopische Direktnachweis und die kulturelle Vermehrung der Erreger in geeigneten Nährmedien mit nachfolgender phänotypischer Charakterisierung gelten als Goldstandard für den Nachweis von bakteriellen und fungalen Pathogenen in klinischem Probenmaterial.

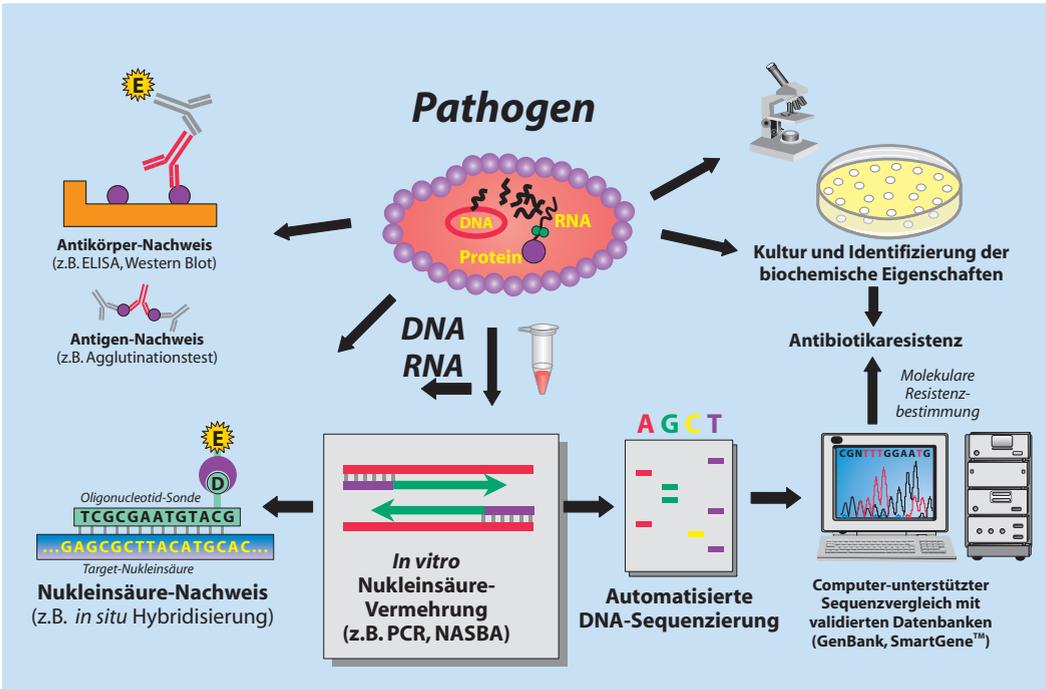
In der Bakteriologie erlaubt ein positives Grampräparat bereits kurz nach dem Probeneingang eine initiale Therapieempfehlung. Nach erfolgreicher Anzucht der Erreger kann eine wesentlich präzisere Aussage über die im Probenmaterial vorliegenden Spezies mitgeteilt werden. Diese Art der Diagnostik hat sich unter steter Optimierung der jeweiligen Untersuchungsverfahren und -reagenzien bewährt, kann trotz relativ hohem Personalaufwand ökonomisch durchgeführt werden und liefert die für den Kliniker wertvollen Aussagen über die Vermehrungsfähigkeit und das Resistenzprofil der nachgewiesenen Erreger. Naturgemäß eignet sich dieses Vorgehen weniger für den Nachweis von langsam wachsenden oder nicht-kultivierbaren Erregern, sowie für die Untersuchung von Probenmaterial von antibiotisch vorbehandelten Patienten. Abhängig von der Art der angeforderten Untersuchungen und dem Wachstumsverhalten der Erreger kann die abschließende Befundung mitunter Tage oder gar Wochen in Anspruch nehmen – möglicherweise zu lange für

eine rechtzeitige Entscheidung zur Einleitung einer spezifischen und erfolgreichen antibiotischen Therapie.

Im Bereich der Virologie basiert die Diagnostik neben dem Direktnachweis per Elektronenmikroskopie, der Virusanzucht in Zellkultur oder immunologischen Verfahren wie ELISA, Western Blot oder Immunfluoreszenz bereits häufig auf dem hier beschriebenen Nachweis viraler Nukleinsäuren. Die Vorteile immunologischer Nachweisverfahren liegen vor allem in der hohen Sensitivität, den kurzen Detektionszeiten, den relativ niedrigen Kosten und nicht zuletzt in der Möglichkeit der Bestimmung des Infektionsstadiums (IgM, IgG). Diese Assays weisen im Rahmen ihres routinemäßigen Einsatzes aber auch methodenbedingte Nachteile auf. Selbst bei immunkompetenten Personen gibt es zwischen dem Zeitpunkt der Infektion und der Ausbildung von Antikörpern ein gewisses "diagnostisches Fenster". Mitunter sind aufgrund der begrenzten Affinität zwischen Antigen und Antikörper auch unspezifische Reaktionen oder Kreuzreaktionen zu beobachten, bei latenten Infektionen fehlen häufig die entsprechenden antigenen Determinanten im zu analysierenden Probenmaterial. Bestimmte Erreger können aufgrund ihrer Antigendrift nicht ausreichend erfasst werden wenn Epitope sich verändern, maskiert werden oder verschwinden. Auch bei Immunsupprimierten oder genetischen Nonrespondern (Personen, die gegen bestimmte Antigene zu keiner Immunreaktion befähigt sind) ist mit immunologi-

| Gruppe    | Erreger (Beispiele)   | Ergebnisse mittels NAT nach | Ergebnis mittels konventioneller Methoden i.d.R. nach |
|-----------|-----------------------|-----------------------------|---|
| Bakterien | Spezies ID            | 3 h                         | Grampräparat 0,5 h<br>Kultur >12 h                    |
|           | Bakterielle Sepsis    | 3-6 h                       | Blutkultur >12 h                                      |
|           | Resistenztestung      |                             | Kultur >14 h  |
|           | MRSA                  | 3 h                         | Kultur >24 h  |
|           | <i>M.tuberculosis</i> | 3 h                         | Kultur >3 Wochen                                      |
| Pilze     | Aspergillus           | 3 h                         | Anzucht >48 h   |
| Viren     | Influenza             | 3 h                         | (Antigentest 0,5 h)<br>Zellkultur ca. 48 h            |

**Tab. 1.1:** Vergleich der durchschnittlichen Analysezeiten (*time-to-result*) von molekularbiologischen und konventionellen Nachweisverfahren bei ausgewählten Infektionserregern.



**Abb. 1.1:** Nukleinsäurediagnostik als integraler Bestandteil des Methodenspektrums in der modernen medizinischen Mikrobiologie.

schen Methoden keine befriedigende bzw. vollständige diagnostische Abklärung möglich.

Die Vorteile der Nukleinsäure-gestützten Nachweismethoden liegen auf der Hand: Aufgrund ihrer universellen Natur können Nukleinsäuren (DNA oder RNA) zum direkten Nachweis und zur Unterscheidung *aller* bekannten Organismen herangezogen werden. Nachweis und Differenzierung von Erregern sind somit nicht mehr von einer erfolgreichen Anzucht, der Bestimmung von phänotypischen Merkmalen oder einer messbaren Immunantwort des infizierten Organismus abhängig.

Wir wollen an dieser Stelle ausdrücklich darauf hinweisen, dass die gewählten Nukleinsäure Zielsequenzen möglicherweise nicht unveränderbar (konserviert) sind und im Falle einer Änderung falsch-negative Ergebnisse der NAT-Methoden zu befürchten sind. Solche Fälle gibt es nicht nur im Bereich der Virologie, wo insbesondere bei RNA-Viren eine höhere Variabilität zu erwarten ist, sondern hat es zum Beispiel auch bei Chlamydien oder bei Speziesmarkern von diagnostisch relevanten Staphylokokken (z.B. MRSA) gegeben.

Unabhängig von der Art des nachzuweisenden Erregers folgt die praktische Durchführung stets dem gleichen Prinzip: nach der Isolierung der Nukleinsäure aus dem Untersuchungsmaterial werden bestimmte erregerspezifische Genomabschnitte *in vitro* vermehrt und anschließend mit einem geeigneten Detektionsverfahren nachgewiesen: "Nukleinsäureisolierung > Amplifikation > Detektion".

## 2. Techniken

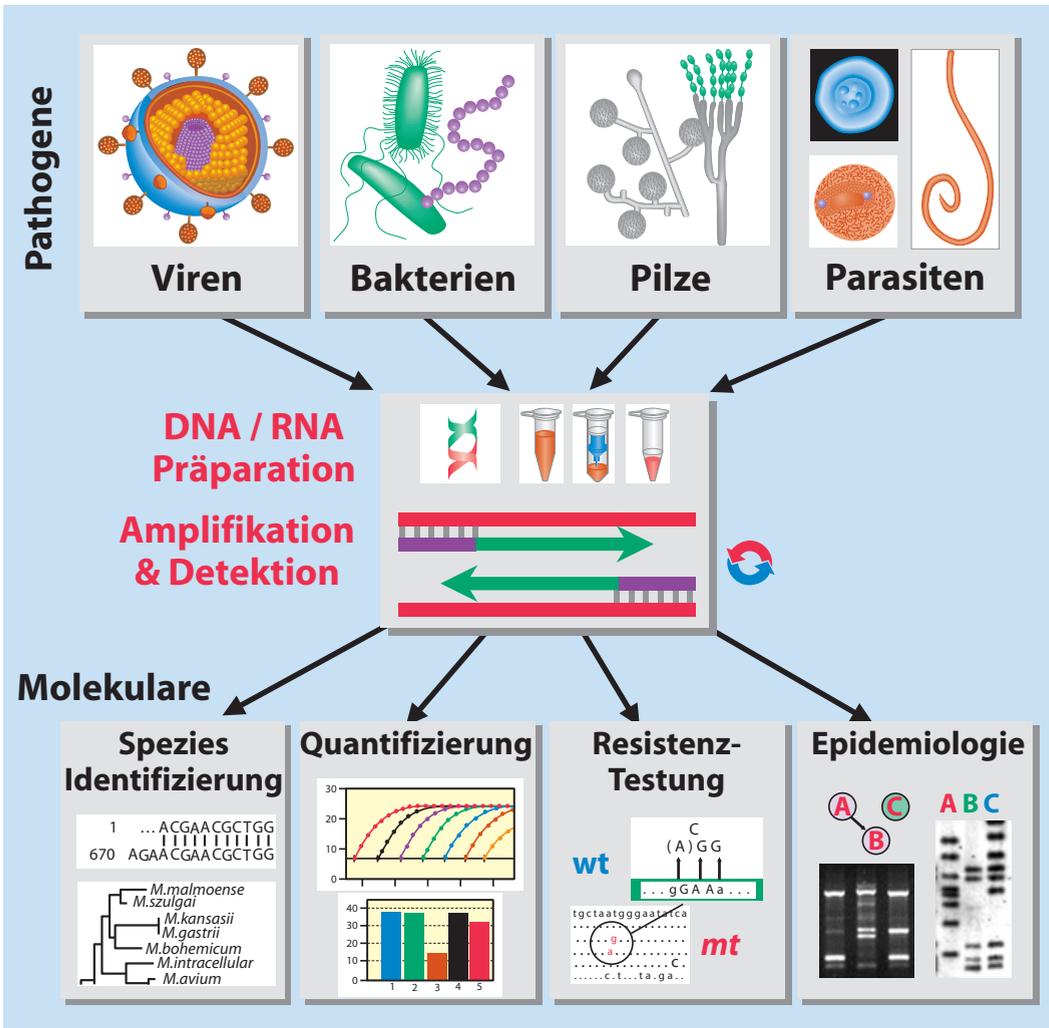


Abb. 2.1: Molekulare Diagnostik in der Medizinischen Mikrobiologie.

### 2.1. Nukleinsäure-Isolierung

In den letzten 15 Jahren lag der Schwerpunkt in Forschung und Entwicklung bei molekularbiologischen Nachweisverfahren auf der Optimierung von Amplifikationstechniken und Detektionsverfahren. Dabei wurden die weniger spektakulären Aspekte der Probenvorbereitung (*sample preparation*) etwas vernachlässigt.

Nachdem nun das Sensitivitätspotential auf Seiten der Amplifikation und Detektion nahezu ausge-

schöpft ist, wird bei der Analyse des gesamten Prozessablaufs immer deutlicher, welcher zusätzliche Sensitivitätsgewinn durch eine möglichst effiziente und gezielte Extraktion von genomischer DNA oder RNA erreicht werden kann. Nach wie vor stellt die Nukleinsäurepräparation ein Hauptproblem (*"bottle-neck"*) für die sensitive Detektion der verschiedenen Erreger aus klinischem Probenmaterial dar, und ist abhängig vom jeweiligen Probenmaterial und Erreger. Viele Viren können aus Serum isoliert werden, wohingegen andere zell-

gebunden sind und nur aus Vollblut gewonnen werden können, und auch bei den Bakterien gibt es Vertreter, die nur intrazellulär zu finden sind.

Der erste Arbeitsschritt, bei dem auch die Ausbeute und Qualität der extrahierten Nukleinsäure maßgeblich bestimmt wird, ist die Lyse der Zielorganismen innerhalb der zu untersuchenden Probe. Abhängig von der Art und Konsistenz des Probenmaterials sowie der Zellwandstruktur der nachzuweisenden Erreger steht hier ein breites Spektrum von mechanischen (z.B. Ultraschallbehandlung oder Zelmühle), chemischen (Inkubation mit chaotropen Salzen wie z.B. Guanidinium-Isothiocyanat, Phenol/Chloroform-Extraktion oder alkalische Lyse) und/oder enzymatischen Methoden (Inkubation mit ProteinaseK, Lysozym oder Zymolase) zur Verfügung.

Eine der gängigsten Strategien zur Nukleinsäurepräparation aus klinischem Probenmaterial sind die Vorinkubation mit Proteinase K und/oder Lysozym zur proteolytischen Zerstörung von Zellwandbestandteilen und intrazellulären Kompartimenten, anschließender Zugabe eines chaotropen Salzes zur Inaktivierung von Nukleasen und Denaturierung aller Proteine im Zellysate und eines Puffers mit hoher Ionenstärke ("Bindungspuffer"), der die Bindung von Nukleinsäuren an eine feste Phase aus Silika bewirkt. Diese befindet sich bei den meisten manuellen Nukleinsäurepräparationskits innerhalb eines Säulchens, und die anschließenden Waschschritte zur Entfernung unspezifisch gebundener Verunreinigungen können in einer Laborzentrifuge abgearbeitet werden. Da die Bindung von Nukleinsäuren an Silikatoberflächen ist von der Ionenstärke und Temperatur abhängig ist, kann die gebundene Nukleinsäure durch Zugabe eines auf bis 80°C erwärmten Nucleosalz-Puffers ("Elutionspuffer") von der Silikatmatrix eluiert werden. Das Eluat kann direkt als Templat (Ausgangsmaterial) für molekularbiologische Verfahren verwendet werden und kann bei -20°C oder -80°C in einem EDTA-haltigen Puffer (Bindung von Metallionen über die Ausbildung von Chelatkomplexen) über viele Jahre aufbewahrt werden.

Im Bereich der medizinischen Mikrobiologie sind einzelne Erregergruppen (wie Pilze, die sog. Sporenbildner oder Mykobakterien-Spezies) bekannt, deren rigide Zellwandstrukturen sich einer Protei-

nase-K-Behandlung erfolgreich widersetzen. Vor der eigentlichen DNA-Reinigung ist hier die Anwendung physikalischer Schritte wie Kochen/Tiefrieren, Ultraschallbehandlung oder der Einsatz einer Zelmühle mit Glaskugeln zur mechanischen Zerstörung der Zellen erforderlich. In vielen Fällen lässt sich die kapsel- oder sporenartige Zellwandstruktur auch durch Vorinkubation mit Zymolase, Glucalase und/oder Lyticase in sog. Spheroplasten überführen, die dann mit chaotropen Salzen effizient aufgeschlossen werden können. Im Umfeld der Mykobakteriendiagnostik hat sich neben verschiedenen physikalischen Verfahren vor allem die Inkubation mit konzentrierter NaOH (alkalische Lyse) und anschließender Neutralisierung als effizientes und routinegängiges Verfahren zur Extraktion genomischer DNA bewährt.

Die wünschenswerte Entwicklung eines universalen Extraktionsverfahren für alle Pathogene gestaltet sich durch die aufgeführten erregerspezifischen Eigenheiten als unmöglich und die bereits kommerziell verfügbaren generischen Nukleinsäureisolierungsverfahren stellen bestenfalls einen "guten Kompromiss" zwischen dem abgedeckten Erregerspektrum, der individuellen Aufschlusseffizienz und dem jeweiligen Grad der Automatisierung dar. Will man bestimmte Erreger mit bestmöglicher Sensitivität nachweisen, so ist aber nach wie vor der Einsatz eines speziell auf diese Erreger-eigenschaften optimierten Extraktionsverfahrens zu empfehlen.

Diese Problematik wurde auch von der Diagnostikindustrie erkannt. Die Hersteller automatisierter Nukleinsäure-Isolierungssysteme gehen dazu über, auf Erregergruppen oder Probenmaterialien abgestimmte Kits oder Verfahren anzubieten. So sind beispielsweise für die MagNA Pure®-Systeme ([www.roche.de/diagnostics/labor/magna\\_pure\\_1c.htm](http://www.roche.de/diagnostics/labor/magna_pure_1c.htm)) von Roche optimierte Extraktionskits für die Isolierung von DNA aus Lebensmitteln und Pflanzen, DNA aus Gewebeproben, DNA von Bakterien und Pilzen, DNA von Mykobakterien sowie Kits für die Präparation von Gesamt-Nukleinsäure (sog. *total nucleic acid*; kurz: Total NA), DNA, Gesamt-RNA oder mRNA aus einer Reihe von Untersuchungsmaterialien verfügbar. Insbesondere die effektive Extraktion viraler RNA stellt für einige Untersuchungsmaterialien eine immer noch nicht voll befriedigend gelöste Herausforderung dar.