

5.5 Stellenwert der Real-Time-PCR in der BT-Erregerdiagnostik

Andreas Nitsche

Zusammenfassung

Bei der Diagnostik infektiöser Erreger bietet die Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) seit Jahren die beste Kombination aus Spezifität, Sensitivität und Geschwindigkeit. Verschiedene Detektionsformate erlauben den Nachweis geringster Mengen eines Erregergenoms innerhalb von wenigen Stunden. Die Anzahl der verfügbaren Real-Time-PCR-Plattformen wächst stetig, wobei unterschiedliche Anforderungen, wie zum Beispiel der Hochdurchsatz oder die Genotypisierung, immer spezieller erfüllt werden können.

Diagnostische Parameter wie die Spezifität, die Sensitivität, aber vor allem die benötigte Zeit bis zu einer verlässlichen Diagnose stellen bei der Diagnostik Bioterror (BT)-relevanter Erreger wesentliche Kriterien dar. Am Beispiel der Pockendiagnostik werden verschiedene Ansätze der Real-Time-PCR sowie deren Möglichkeiten und Grenzen und zukünftige Ziele dargestellt.

Erregernachweis

Der Nachweis infektiöser Erreger zählt heutzutage zum Routinerepertoire eines klinisch orientierten Diagnostiklabors. Dabei können Erregerpartikel, Erregerproteine oder Erregergenome entweder **direkt** nachgewiesen werden oder es wird die Bildung von erregerspezifischen Antikörpern im infizierten Organismus gezeigt, was man deshalb als **indirekten** Erregernachweis bezeichnet. Zu den direkten Nachweismethoden eines Erregers zählen die Elektronenmikroskopie (EM), der immunocytochemische Nachweis, die Zellkultur und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die EM als *catch-all*-Methode zielt nicht auf den Nachweis eines bestimmten Erregers ab, sondern kann in kurzer Zeit alle Erreger darstellen, die in ausreichender Konzentration in der zu untersuchenden Probe vorhanden

sind (Gentile & Gelderblom, 2005; Hazelton & Gelderblom, 2003). Die Konzentration der mit Sicherheit zu detektierenden Partikel ist jedoch mit $\sim 10^6$ /mL sehr hoch (Biel et al., 2004) und wird zwar bei der Untersuchung akut klinischer Proben oft erreicht, könnte aber gerade in BT-verdächtigen Umweltproben für eine Detektion zu niedrig sein. Ist eine EM-Diagnose jedoch positiv, kann man von einer hohen Erregerlast ausgehen und erhält gleichzeitig Aufschluss über die Morphologie der Partikel und damit deren taxonomische Zuordnung. Selbst bei intakter Morphologie ist deren Infektiosität dadurch streng genommen jedoch nicht bewiesen, aber sehr wahrscheinlich und speziell im akut klinischen Patienten ausreichend. Bei der Zellkultur werden die Erreger in einem geeigneten Zellsystem vermehrt und anhand eines typischen Wachstums oder eines charakteristischen zytopathischen Effektes diagnostiziert. Die Identifizierung des Erregers kann dann mit Hilfe spezifischer Antikörper im Immunfluoreszenztest erfolgen. Diese Methode ist sehr spezifisch, kann unter idealen Bedingungen hoch sensitiv sein und nur ein einziges infektiöses Partikel nachweisen, erfordert jedoch einen großen materiellen Aufwand, der einen Routinebetrieb oder den Hochdurchsatz schwierig gestaltet. Je nach Erreger beträgt die Zeit bis zu einem verlässlichen Ergebnis ein bis mehrere Tage.

Die PCR ist im Vergleich zur EM und der Zellkultur eine sehr schnelle und gleichzeitig sensitive Methode (Mackay, Arden & Nitsche, 2002). Je nach verwendetem Verfahren kann pro Reaktion ein Nachweis von <10 Genomäquivalenten (GÄ) eines Erregers innerhalb von wenigen Stunden erfolgen. Im Gegensatz zur EM, die den Erreger selbst abbildet, und zur Zellkultur, die das Wachstum des Erregers und damit seine Infektiosität nachweist, kann die PCR lediglich Nukleinsäuren nachweisen, also die Gene oder Genome eines Erregers. In einer klinischen Probe mit entsprechender klinischer Diagnose ist der Nachweis der Nukleinsäure eines in Frage kommenden Erregers als Bestätigung zumeist ausreichend. In BT-verdächtigen Umweltproben ist eine Einschätzung der individuellen Situation, zum Beispiel der vorgefundenen Erregerkonzentration, notwendig, um den Nachweis der Nukleinsäure als relevant zu betrachten oder daraufhin einen eindeutigen Nachweis der Infektiosität mit Hilfe der Zellkultur durchzuführen.

Die unterschiedlichen Möglichkeiten der hier beschriebenen Methoden legen nahe, dass eine Kombination von verschiedenen Methoden immer sinnvoll ist und die Grundlage eines verlässlichen Ergebnisses darstellen sollte.

Polymerase-Kettenreaktion

Während die EM und die Zellkultur bereits seit langer Zeit in der Erregerdiagnostik eingesetzt werden, ist die PCR daran gemessen als eine neue Methode zu betrachten. Erste Ideen einer DNA-Amplifikation *in vitro* wurden bereits Anfang der 1970er Jahre publiziert. Den Durchbruch schaffte jedoch Kary B. Mullis mit einer Publikation im Jahre 1985 (Saiki et al., 1985), wofür er im Jahr 1993 zusammen mit Michael Smith von der British Columbia University den Nobelpreis für Chemie verliehen bekam. Seit den ersten Publikationen zur PCR im Jahre 1985 steigt deren Anzahl jährlich exponentiell und hat im Jahr 2004 eine Gesamtzahl von etwa 250.000 erreicht. Darin spiegelt sich wieder, dass die PCR wie keine andere Methode die Welt der Biowissenschaften beeinflusst hat. Worin liegt nun das enorme Potenzial der PCR?

PCR kann mit Hilfe einer temperaturabhängigen, zyklischen Amplifikation in kurzer Zeit mit hoher Präzision große Mengen eines definierten DNA-Fragments herstellen, ähnlich einem DNA-Kopierer. Dieses DNA-Fragment wird dadurch in enorm großen Mengen verfügbar, die eine einfache Visualisierung und weitere Charakterisierung erlauben. In einem Amplifikationszyklus wird unter idealen Bedingungen die Menge des DNA-Fragmentes verdoppelt (2^n), was nach 40 Zyklen der Amplifikation ungefähr 1×10^{12} PCR-Produkte ergibt. In diesem enormen Vervielfältigungspotenzial liegt andererseits auch die Gefahr, durch Kontamination mit bereits erzeugten PCR-Produkten in weiteren PCR-Reaktionen falsch positive Ergebnisse zu erzeugen (Kwok & Higuchi, 1989). Die in der Regel der konventionellen PCR folgende Gelelektrophorese bedeutet die Handhabung von extrem großen Mengen des PCR-Produkts, welches man mit derselben PCR wieder amplifizieren könnte. Um dies zu vermeiden, wird eine Reihe von biochemischen (Jinno, Yoshiura & Niikawa, 1990) oder enzymatischen Lösungen der so genannten *carry-over-protection* verwendet (Pang, Modlin & Yolken, 1992), aber auch die einfache räumliche Trennung der Labore für Vor- und Nach-PCR kann dieser Gefahr vorbeugen.

Real-Time-PCR

Im Jahre 1996 erschienen die ersten Publikationen, in denen praktikable Formate der Real-Time-PCR beschrieben wurden (Heid, Stevens, Livak & Williams, 1996). Die Real-Time-PCR ist als eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR anzusehen, im Vergleich zu der sie speziell für die Diagnostik eine Reihe von Vorteilen hat:

1. ein schnelles Ergebnis,
2. das Entfallen jeglicher Post-PCR-Bearbeitung der Proben und damit ein minimiertes Risiko der Kontamination und
3. die Möglichkeit der akkuraten Quantifizierung.

Jedes dieser Attribute stellt eine wesentliche Anforderung an die verlässliche Diagnostik infektiöser Erreger dar (Mackay, Arden & Nitsche, 2004), wodurch die Real-Time-PCR bei der Detektion BT-relevanter Erreger sehr schnell an Bedeutung gewonnen hat.

Das Prinzip der Real-Time-PCR beruht auf der gleichzeitigen Amplifikation und Detektion des in jedem Zyklus der PCR-Reaktion gebildeten PCR-Produktes. Dadurch kann zu jedem Zeitpunkt der PCR-Reaktion beobachtet werden, ob und in welchem Ausmaß es zu einer Amplifikation des gesuchten DNA-Fragmentes in der untersuchten Probe kommt.

Zurzeit ist eine Reihe von Formaten bekannt, die eine Real-Time-PCR-Detektion ermöglichen. Alle praktikablen Formate basieren dabei auf der Erzeugung oder Auslöschung eines Fluoreszenzsignals, das in jedem Zyklus der PCR-Reaktion zu der Menge des gebildeten PCR-Produktes proportional ist. Man unterscheidet dabei spezifische Detektionsformate von unspezifischen Detektionsformaten.

Das am weitesten verbreitete unspezifische Format der Real-Time-PCR-Detektion verwendet zusätzlich zu den in jeder PCR erforderlichen zwei Primern den Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen (Abb. 59 A). SybrGreen bindet bevorzugt an doppelsträngige DNA (Schneeberger, Speiser, Kury & Zeillinger, 1995), wie PCR-Produkte, und emittiert dann nach Anregung mit einer geeigneten Strahlungsquelle Licht einer definierten Wellenlänge. In einem PCR-Gerät, das während der Amplifikation stetig Licht dieser Wellenlänge detektieren kann, ist somit die Akkumulation des PCR-Produktes *online*, also

direkt während der Messung, verfolgbar. Einige auf dem Markt befindliche Geräte erlauben diese Detektion tatsächlich direkt während der PCR-Reaktion und damit eine extrem schnelle unmittelbare Beurteilung der untersuchten Probe. Die Vorteile der Verwendung von SybrGreen sind die einfache Umwandlung einer konventionellen PCR-Reaktion in eine Real-Time-PCR und der niedrige Preis von SybrGreen. Ein schwerwiegender Nachteil ist jedoch, dass SybrGreen an jede Form von doppelsträngiger DNA bindet, also auch an ungewünschte PCR-Produkte oder Primer-Dimere (Abb. 59 A), die sehr häufig in PCR-Reaktionen gebildet werden, gerade wenn die Menge an Ziel-DNA sehr niedrig ist (Vandesompele, De Paepe & Speleman, 2002). Für die Erregerdiagnostik kann das bedeuten, dass eine Unterscheidung einer kleinen Menge des gesuchten Erregers erschwert wird. SybrGreen und andere so genannte unspezifische Detektionsformate sind dementsprechend für eine sensitive Diagnostik nicht die verlässlichste Lösung.

Dem gegenüber stehen die so genannten spezifischen Detektionsformate der Real-Time-PCR. Spezifisch bedeutet in diesem Zusammenhang, dass durch die Verwendung zusätzlicher Oligonukleotide (Sonden), die eine Sequenz aus dem PCR-Produkt darstellen, nur die gewünschten PCR-Produkte zu einer messbaren Signalbildung führen, jedoch nicht unbeabsichtigt erzeugte falsche PCR-Produkte oder Primer-Dimere. Die Sonde garantiert also die Detektion ausschließlich des gewünschten PCR-Produktes, was eine zusätzliche Ebene der Spezifität darstellt.

Der Aufbau und das Messprinzip der verwendeten Sonden sind mittlerweile sehr vielfältig. Das erste praktikable Format war die so genannte TaqMan-Sonde oder 5'-Nuklease-Sonde (Abb. 59 B). Bei dieser Sonde handelt es sich um ein Oligonukleotid, das an den gegenüber liegenden Enden mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist (Heid, Stevens, Livak & Williams, 1996). Der zumeist am 5'-Ende befindliche Reporterfarbstoff fluoresziert nach Anregung in einer definierten Wellenlänge. Diese Fluoreszenz wird jedoch auf den am 3'-Ende befindlichen Quencherfarbstoff übertragen, wodurch die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes nicht mehr detektierbar ist. Solange sich Reporterfarbstoff und Quencherfarbstoff in räumlicher Nähe befinden, also an dasselbe Sondenmolekül gebunden sind, kann keine Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes detektiert werden. Wird nun aber während der PCR-Extensionsphase der Primer durch die Taq-DNA-Polymerase verlängert, der auf denselben DNA-Einzelstrang bindet wie die TaqMan-Sonde, so wird diese Sonde durch die

5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase hydrolysiert. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen Reporterfarbstoff und Quencherfarbstoff aufgehoben, und die Anregung des Reporterfarbstoffes kann nun im Gerät *online* detektiert werden (Abb. 59 B). Sind die Reaktionsbedingungen gut eingestellt, wird jedes PCR-Produktmolekül durch die Bindung und den Verdau einer TaqMan-Sonde in Form eines Fluoreszenzsignals gemessen. Vorteile dieses Formates der Real-Time-PCR sind ein diagnostischer Nachweis auch geringer Mengen eines Erregers mit hoher Spezifität und Reproduzierbarkeit, weshalb diese Sonden bei der Diagnostik BT-relevanter Erreger häufig verwendet werden (Mackay, 2007). Eine Reihe von Publikationen beschreibt den Nachweis von Orthopockenviren auf der Basis von TaqMan-Sonden (Ibrahim et al., 2003; Kulesh et al., 2004).

Darüber hinaus können TaqMan-Sonden nach Markierung mit verschiedenen Reporterfarbstoffen zur Multiplex-PCR-Detektion verwendet werden. Nachteile des TaqMan-Formates sind die zusätzlichen Kosten für die Synthese einer TaqMan-Sonde und die Voraussetzung einer geeigneten Sequenz von etwa 25-30 Basen Länge für die Lokalisation der TaqMan-Sonde im PCR-Produkt. Gerade bei wenig konservierten Sequenzen innerhalb einer Erregergruppe kann dies zu Problemen bei der Auswahl einer Sonde führen. Um dieses Problem zu umgehen, können TaqMan-Sonden durch Modifikation mit so genannten Minor Groove Binders modifiziert werden, die zu einer festeren Bindung der TaqMan-Sonden führen und damit eine deutlich verkürzte Sondenlänge von etwa 12-15 Basen zulassen (Kutyavin et al., 2000). Neben diesem TaqMan- oder 5'-Nuklease-Format existieren weitere Formate, die auf dem Prinzip der räumlichen Trennung zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen beruhen, wie die *Molecular Beacons* (Tyagi, Bratu & Kramer, 1998), *Molecular Scorpions* (Thelwell, Millington, Solinas, Booth & Brown, 2000) und in abgewandelter Form die *Self-quenched Primers* (Nazarenko et al., 2002), bei denen nur ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet wird.

Auf dem gegenteiligen Prinzip, der Schaffung räumlicher Nähe von zwei Fluorophoren, basiert das Prinzip der Hybridisierungs-Sonden (Abb. 59 C). Man setzt dabei zwei Oligonukleotide als Sonden ein, die nebeneinander auf einem der PCR-Produkt-Einzelstränge binden, wobei eine Lücke von ein bis fünf Basen zwischen den Sonden eingehalten wird (Wittwer et al., 1997). An die in 5' Richtung liegende Sonde ist an das 3' Ende ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der so genannte Donor. Die in 3' Richtung liegende Sonde

trägt an ihrem 5' Ende einen Fluoreszenzfarbstoff, den Akzeptor (Abb. 59 C). Befinden sich die beiden Sonden frei in Lösung, führt die Anregung mit einer LED zur Fluoreszenz des Donor-Farbstoffes, dessen Signal jedoch nicht detektiert wird. Der Akzeptor kann von der LED nicht angeregt werden. Binden die beiden Sonden aber während der Annealing-Phase der PCR-Reaktion nebeneinander, kommen Donor und Akzeptor in räumliche Nähe und die Anregung des Donors führt zur Energieübertragung (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, FRET) auf den Akzeptor, der dadurch angeregt werden kann und in einer vom Gerät detektierten Wellenlänge fluoresziert (Abb. 59 C). Im Gegensatz zum TaqMan-Format ist hier also die Schaffung der räumlichen Nähe erforderlich (Nitsche, Steuer, Schmidt, Landt & Siegert, 1999), was nur in der Annealing-Phase der PCR möglich ist. Das Signal bricht in der Extensionsphase zunächst wieder zusammen und wird in jedem Zyklus neu gebildet, ist also reversibel.

Diesen Umstand kann man bei der Schmelzkurvenanalyse nutzen, welche direkt im Anschluss an die PCR im selben Reaktionsgefäß durchgeführt werden kann. Dabei werden die PCR-Produkte bei 95 °C denaturiert und schnell abgekühlt, wobei es zur benachbarten Bindung der Hybridisierungs-Sonden kommt und ein Fluoreszenzsignal messbar wird (Abb. 60 A). Wird nun langsam wieder die Temperatur erhöht, beginnen die Sonden bei einer für sie charakteristischen Temperatur vom PCR-Produkt-Einzelstrang abzuschmelzen. Die Temperatur, bei der dieses geschieht, hängt von der Basenzusammensetzung und Basensequenz der Sonden ab. Beginnen die Sonden abzuschmelzen, kann man einen Zusammenbruch des Fluoreszenzsignals beobachten (Abb. 60 B, blaue Kurve). Eine mathematische Ableitung dieser Schmelzkurve ($-dF/dT$) resultiert in einem charakteristischen Schmelzpunkt für diese Sonden, die perfekt komplementär zum PCR-Produkt sind (Abb. 60 D, blaue Kurve). Befindet sich im Bindungsbereich einer der Hybridisierungs-Sonden eine Fehlbasenpaarung, bindet die Sonde nicht mehr perfekt (Abb. 60 C).

In der Schmelzkurvenanalyse wird eine Sonde mit einer Fehlbasenpaarung dementsprechend bereits bei einer niedrigeren Temperatur abschmelzen (Abb. 60 B, rote Kurve), als wenn sie perfekt passen würde, was nach Ableitung in einem geringeren Schmelzpunkt resultiert (Abb. 60 D, rote Kurve). Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kann also eine Genotypisierung im Anschluss an die PCR erfolgen, was am Beispiel der Pockenvirus-Diagnostik zur Identifizierung von Variolavirus oder Vaccinia-Virus etabliert ist. Eine

Reihe von Real-Time-PCR-Assays ist bereits publiziert, die in verschiedenen Genen Variolavirus-spezifische Polymorphismen nutzen, um nach einer generischen Amplifikation aller Orthopockenviren mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse Variolavirus zu identifizieren (Nitsche, Ellerbrok & Pauli, 2004; Nitsche, Steger, Ellerbrok & Pauli, 2005; Olson et al., 2004). Ein verlässliches Ergebnis einschließlich einer Genotypisierung ist damit unmittelbar nach dem PCR-Lauf verfügbar. Allen Real-Time-PCR-Formaten ist gemein, dass sie so genannte *closed-tube*-Verfahren darstellen, d. h. mit dem Start der PCR-Reaktion bleibt das Reaktionsgefäß bis zum vollständigen Abschluss der Analyse verschlossen und muss nicht geöffnet werden, womit das oben beschriebene Risiko der Kontamination durch PCR-Produkte extrem minimiert wird.

Die Verwendung von quantifizierten Standards des zu untersuchenden Erregers erlaubt durch den Vergleich der Signale unbekannter Proben (CT-Wert) darüber hinaus eine exakte Quantifizierung dieser unbekannt Probe.

Wie die Anzahl gut funktionierender Real-Time-PCR-Formate, von denen hier nur die prominentesten beschrieben sind, ist auch die Anzahl der auf dem Markt befindlichen Real-Time-PCR-Geräte stetig gewachsen. Das erste Real-Time-PCR-Gerät, welches 96 Proben simultan analysieren konnte, war der ABI Prism 7700 SDS von Firma Applied Biosystems. Mittlerweile werden Real-Time-PCR-Geräte von verschiedenen Firmen wie Bio-Rad, Cepheid, Corbett Robotics, Stratagene, Idaho Technology, Bioneer und Techne angeboten, wobei diese Aufzählung keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt! Eine Besonderheit ist der LightCycler von Roche Applied Science, der für die Anwendung von Hybridisierungs-Sonden entwickelt wurde und mittlerweile in neueren Versionen zahlreiche Farbstoffe und Formate detektieren kann. Hier wird die PCR-Reaktion in bis zu 32 Glaskapillaren durchgeführt, welche eine extrem hohe Wärmeleitfähigkeit besitzen und durch hohe Heiz- und Kühlraten sehr kurze Reaktionszeiten ermöglichen. Jedes Real-Time-PCR-Gerät ist für individuelle Anwendungen mehr oder weniger gut geeignet. Der Anwender sollte vor der Anschaffung definieren, welche Anforderungen er an das Real-Time-PCR-Gerät stellt. Wesentliche Unterschiede zwischen verschiedenen Geräten bestehen bezüglich des Probendurchsatzes (32 bis 384 Proben), der Fluoreszenzanregungsquelle (Laser, Halogenlampe), des geeigneten Verbrauchsmaterials (Reaktionsgefäße, Platten, Kapillaren) und nicht zuletzt in der Größe (Portabilität) und der Bedienfreundlichkeit. Einen Vergleich dieser Geräte findet man unter www.biocompare.com.

Etablierungsschritte

Etabliert man einen Real-Time-PCR-Assay für einen bestimmten Erreger, so ist eine stabile und spezifische PCR-Reaktion wesentliche Voraussetzung. Dies kann auch ein bereits bekannter konventioneller PCR-Assay sein. Primer, die in der konventionellen PCR zufrieden stellende Ergebnisse geliefert haben, werden in der Regel auch in der Real-Time-PCR mit einer kompatiblen Detektionssonde gute Ergebnisse erzielen. Wie für die Auswahl von PCR-Primern gibt es auch für die Auswahl von Detektionssonden Regeln (Mackay, 2007), die einen Erfolg zwar nie garantieren können, jedoch die Wahrscheinlichkeit erhöhen, einen verlässlichen PCR-Assay zu erhalten. Kritische Faktoren sind die Länge des PCR-Produktes, die eventuelle Komplementarität zwischen den Primern und den Detektionssonden und die Faltung des PCR-Produktes unter den Bedingungen der PCR. Verschiedene Hersteller bieten beim Kauf eines Real-Time-PCR-Gerätes Software an, die als Hilfestellung bei der Auswahl eines Assays verwendet werden kann. Die Qualität dieser Software kann dabei stark variieren.

Eine gut ausgewählte Real-Time-PCR sollte jedenfalls exponentielle Kurvenverläufe ergeben (Abb. 61, hellgraue Kurve). Ist der Kurvenverlauf eher linear als exponentiell (Abb. 61, schwarze Kurve), verläuft die PCR nicht symmetrisch und Optimierungen bezüglich der Primerkonzentration oder Primersequenzen sind notwendig.

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze eines PCR-Assays werden entweder quantifizierte Mengen der DNA des Erregers oder quantifizierte Mengen eines Plasmides, die das PCR-Produkt enthalten, in Verdünnungen gemessen. Eine gute Real-Time-PCR kann dabei weniger als zehn Kopien der Erreger-DNA erkennen, wobei aus statistischen Erwägungen der Einsatz von genau zehn Kopien der Erreger-DNA in eine PCR-Reaktion natürlich nicht garantiert werden kann. Deshalb wird heutzutage die Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit eines PCR-Assays durch wiederholte Messungen verschiedener Erreger-DNA-Mengen, bis unter die theoretische Nachweisgrenze, an verschiedenen Tagen durchgeführt und die Ergebnisse mit Hilfe einer Probit-Analyse ausgewertet (Olson et al., 2004). Dadurch lässt sich bestimmen, welche Menge Erreger-DNA mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit, z. B. 95 Prozent, mit diesem Assay detektiert werden kann.

Als Sensitivität bezeichnet man im Zusammenhang mit der Real-Time-PCR die Veränderung des erzeugten Signals bei Veränderung der Menge an Erreger-DNA, die gemessen wird. Da bei der PCR-Reaktion ein Zyklus unter idealen Bedingungen eine Verdopplung der Produktmenge bedeutet und die Intra-Assay-Variabilität bei einem gut etablierten Real-Time-PCR-Assay weniger als einen Zyklus beträgt, ist in der Regel eine Verdopplung der Menge Erreger-DNA gut nachweisbar, zumeist aber auch viel weniger. Bemerkenswert ist, dass diese Genauigkeit über einen linearen Nachweisbereich von 10^7 Kopien bis hin zu zehn Kopien der Erreger-DNA möglich ist, ein Bereich, den sonst keine Methode der Nukleinsäure-Detektion bietet (Nitsche, Steuer, Schmidt, Landt & Siegert, 1999).

Soll ein Real-Time-PCR-Assay spezifisch für den gewünschten Erreger sein, müssen beim Design des Assays alle unerwünschten Erreger theoretisch durch geschickte Auswahl der Primer oder der Sonde ausgeschlossen werden. Die Spezifität eines Real-Time-PCR-Assays kann also auch auf der Ebene der Sondenbindung geschaffen werden, wobei die DNA des unerwünschten Erregers zwar von den Primern amplifiziert, jedoch nicht von der Sonde detektiert werden kann, weil die Sonde an dessen Sequenzen nicht bindet. Wenn möglich wird allerdings die spezifische Amplifikation angestrebt, um das Risiko falsch positiver Ergebnisse so gering wie möglich zu halten. Bei der Verwendung von Hybridisierungs-Sonden oder anderer Sondenformate, die eine anschließende Schmelzkurvenanalyse erlauben, kann die Spezifität für den gewünschten Erreger auf dieser Ebene erreicht werden. Dabei werden alle Erreger amplifiziert und detektiert, jedoch der betreffende Erreger-Genotyp mit Hilfe der oben beschriebenen Schmelzkurvenanalyse identifiziert, wie weiter oben bereits für die Diagnostik von Orthopockenviren und Variolavirus beschrieben wurde (Nitsche, Ellerbrok & Pauli, 2004; Nitsche, Steger, Ellerbrok & Pauli, 2005; Olson et al., 2004).

Unabhängig vom Format und trotz der Tatsache, dass sorgfältig ausgewählte Real-Time-PCR-Assays einen hohen Erfolg bei der Spezifität versprechen, muss letztlich diese Spezifität in der Praxis bewiesen werden. Dazu ist es erstrebenswert, so viele verschiedene Erreger wie möglich, die entweder in ein positives Ergebnis eingeschlossen oder aber auch davon ausgeschlossen werden sollen, in der Praxis zu testen. Dies stellt häufig die größte Herausforderung dar, da abhängig vom untersuchten Erreger geeignetes Probenmaterial sehr selten oder gar nicht frei verfügbar sein kann, wie das Beispiel der Variolaviren zeigt.

Die Fachliteratur beschreibt eine Vielzahl gut etablierter und evaluierter Assays zu vielen Erregern (Mackay et al., 2004; Mackay, Arden & Nitsche, 2002), aber auch kommerziell erhältliche Kits sind für viele Anwendungen hervorragend, wenn auch nicht immer ganz kostengünstig zu erhalten (eine Liste der im Robert Koch-Institut verwendeten Real-Time-PCR-Assays kann beim Autor erfragt werden).

Post-Real-Time-PCR-Analysen

Obwohl der große Vorteil der Real-Time-PCR die Geschwindigkeit und das *closed-tube*-Format sind, sollte man die zahlreichen analytischen Methoden nicht außer Acht lassen, die zur zusätzlichen Bestätigung der Amplifikation des richtigen Erregers oder der weiteren Charakterisierung des PCR-Produktes eingesetzt werden können. Neben der bereits beschriebenen Schmelzkurvenanalyse, die die Richtigkeit einer Sequenz im Bereich der Sondenbindungsstellen beweisen und darüber hinaus zur Genotypisierung verwendet werden kann, lassen sich Real-Time-PCR-Produkte nach einer klassischen Aufreinigung des PCR-Produktes mit Standardmethoden sequenzieren. Dies schafft eine zusätzliche Bestätigung der in der Real-Time-PCR erhaltenen Ergebnisse und kann zur genaueren Typisierung des Erregers hilfreich sein. Auch neuere Methoden der Sequenzierung wie die Pyrosequenzierung können auf Real-Time-PCR-Produkte angewendet werden (Elahi & Ronaghi, 2004). Der große Vorteil dieser Methode liegt dabei darin, dass Ergebnisse der Sequenzierung online präsentiert werden und man im Modus der *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)-Analyse innerhalb von wenigen Minuten die Basenabfolge eines aussagekräftigen Polymorphismus bestimmen kann.

Andere Verfahren, die ihre Vorteile in einer Multiplex-Detektion haben, sind die massenspektroskopische Analyse der PCR-Produkte (Briese et al., 2005) oder deren Auswertung auf Chips (Los et al., 2005; Nebling, Grunwald, Albers, Schafer & Hintsche, 2004). Ziel ist dabei der Nachweis verschiedener Erreger in einem Schritt direkt im Anschluss an eine getrennt durchgeführte PCR-Reaktion oder im Idealfall im Anschluss an eine Multiplex-PCR, die alle relevanten Erreger mit zufrieden stellender Empfindlichkeit nebeneinander erfasst. Diese Methoden befinden sich zurzeit in der Entwicklung, werden aber in Zukunft die Diagnostik BT-relevanter Erreger sehr erleichtern können.

Schlussfolgerung

Die PCR ist sicher nicht die „eierlegende Wollmilchsau“ der Diagnostik infektiöser Erreger, auch die Real-Time-PCR ist es nicht. Betrachtet man, was die PCR nachzuweisen nicht im Stande ist, nämlich intakte Partikel, deren Infektiosität oder erregerspezifische Proteine, mag man zuerst am Nutzen der PCR zweifeln. Aber speziell aus der Sicht der Diagnostik infektiöser Erreger ist gerade die Real-Time-PCR die Methode, die beim Kompromiss aus Nachweisgrenze und Zeit als die beste Methode erscheint.

Jede Situation erfordert eine individuelle Abschätzung der Aussagekraft einer diagnostischen Methode. Eine akut klinische Probe einer mit Pocken infizierten Person enthält erfahrungsgemäß ausreichend viele Pockenpartikel, um diese mit der EM innerhalb von 15 Minuten nachweisen zu können. Hier würde die PCR zur Bestätigung und Genotypisierung dienen, würde aber sicher mehr Zeit bis zu einem Ergebnis erfordern als die EM. Was aber, wenn die Viruslast niedrig, das Material schlecht konserviert oder die Anzahl der zu untersuchenden Proben sehr hoch ist? In jedem dieser Fälle wäre die Real-Time-PCR schneller und verlässlicher als der Nachweis des Erregers in der Zellkultur oder mittels EM.

Für routinemäßig anfallende Diagnostik scheint die Real-Time-PCR die Methode der Wahl zu sein. Je nach verwendeter Plattform kann die PCR-Reaktion einschließlich der Analyse innerhalb von 40 bis 120 Minuten erfolgen, wobei der Hochdurchsatz von bis zu 384 Proben pro PCR-Lauf möglich ist. Das Risiko der Kontamination ist trotz des enormen Vervielfältigungspotenzials der PCR bei der Real-Time-PCR nahezu ausgeschlossen, womit ein Ergebnis auf Anhieb als sehr verlässlich zu betrachten ist, wenn notwendige Kontrollen mitgeführt wurden. Im Gegensatz zur EM ist für die Erkennung des Erregers weniger Expertise notwendig – eine gut etablierte Real-Time-PCR ist unter standardisierten Bedingungen reproduzierbar und erzeugt leicht zu interpretierende Daten, die objektiv ausgewertet werden können. Wenn es für die Abschätzung des Gefahrenpotenzials einer Probe notwendig ist, kann die Real-Time-PCR ohne zusätzlichen Aufwand exakte, quantitative Ergebnisse liefern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Real-Time-PCR mit all ihren Facetten, auch den zahlreichen Möglichkeiten der Post-Real-Time-PCR-Analyse, in der Erregerdiagnostik eine wesentliche Rolle spielt und in einer Kombination verschiedener Nachweismethoden nicht fehlen sollte.

Danksagung: Ich danke Andreas Kurth für konstruktive Kritik und das sorgfältige Korrekturlesen.

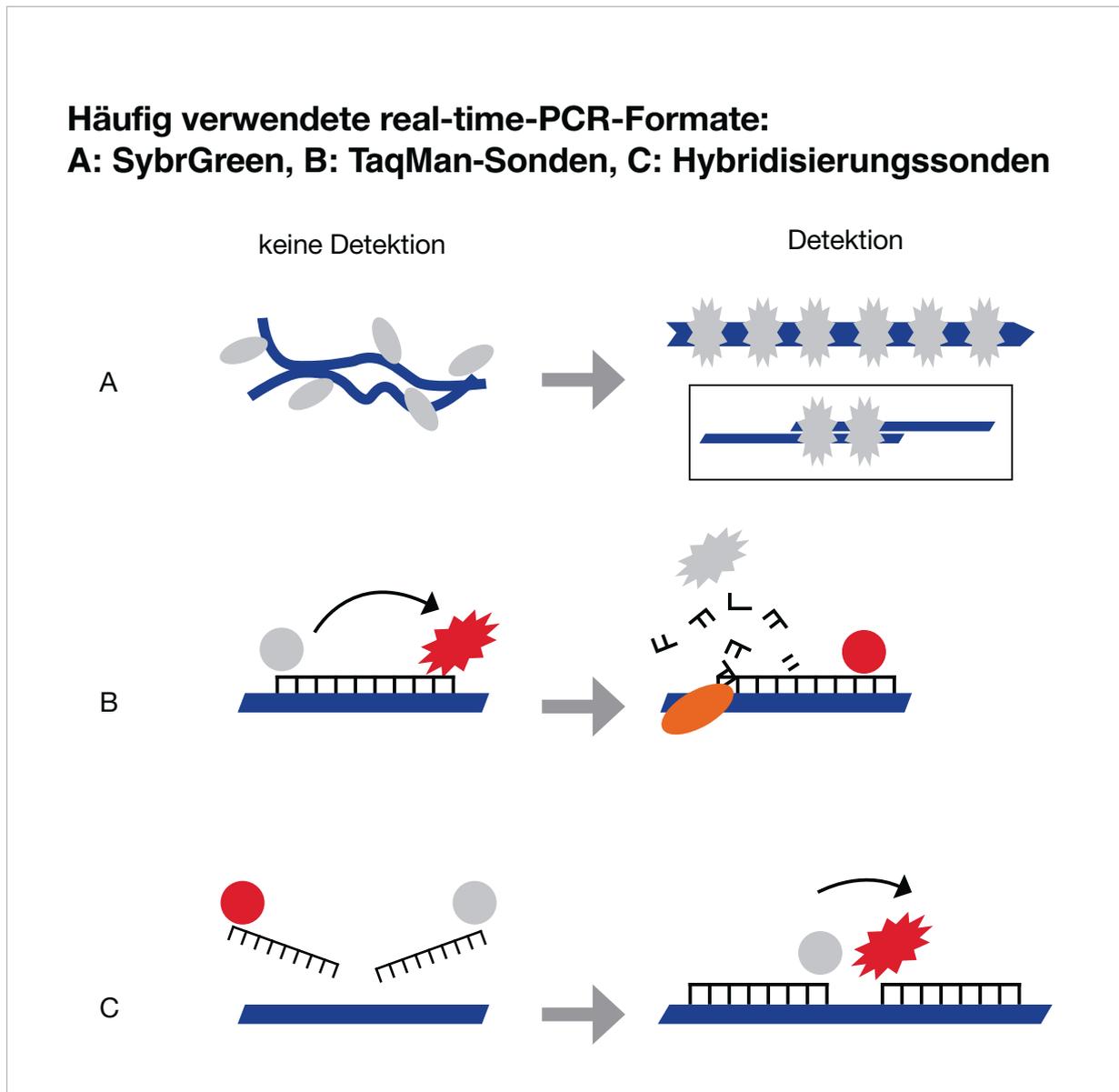


Abb. 59: Schematische Darstellung einiger Real-Time-PCR-Formate

Legenden zu den Abbildungen:

- A. SybrGreen (graue Ovale) bindet bevorzugt an doppelsträngige DNA (blaue Linien) und fluoresziert dann nach Anregung. Dabei wird jede Art doppelsträngiger DNA markiert, auch Primer-Dimere (Kasten). PCR-Produkte können dadurch schwer von Primer-Dimeren zu unterscheiden sein.
- B. TaqMan-Sonden enthalten einen Reporterfarbstoff (grau) und einen Quencherfarbstoff (rot). Wird während der PCR-Reaktion die TaqMan-Sonde durch die Taq-Polymerase (orange Ellipse) hydrolysiert, kommt es zur Aufhebung der räumlichen Nähe von Reporterfarbstoff und Quencherfarbstoff und die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes kann detektiert werden.
- C. Hybridisierungs-Sonden binden benachbart an einen Einzelstrang des PCR-Produktes, wodurch Donor (grau) und Akzeptor (rot) in räumliche Nähe gelangen. Nach Anregung überträgt der Donor seine Energie auf den Akzeptor, dessen Fluoreszenz gemessen wird. Die Signalproduktion ist unabhängig von der Taq-Polymerase.

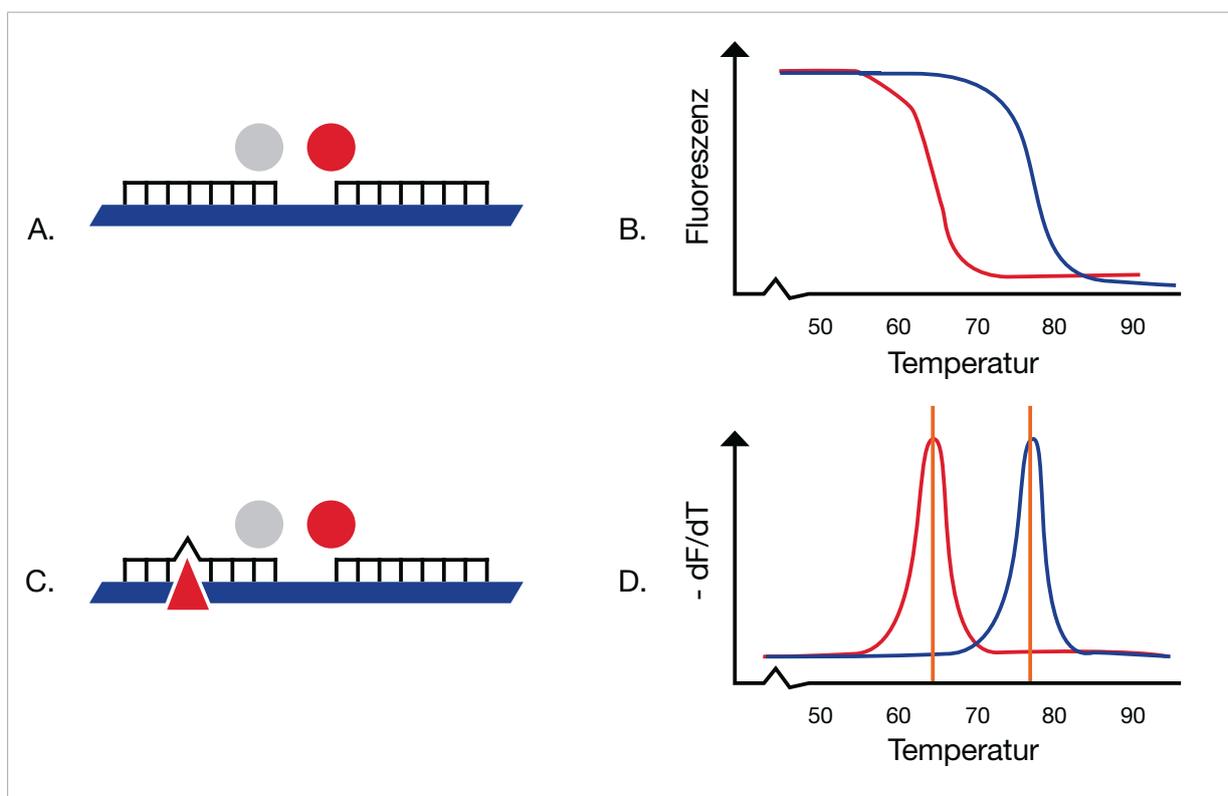


Abb. 60: Schmelzkurvenanalyse zur Genotypisierung mit Hybridisierungssonden

Prinzip der Schmelzkurvenanalyse.

- A. Hybridisierungs-Sonden binden perfekt an einen Einzelstrang des PCR-Produktes.
- B. Schmelzkurvenprofile der perfekt bindenden Sonden aus A (blaue Kurve) und derselben Sonden auf einen DNA-Einzelstrang mit einer Fehlbasenpaarung aus C (rote Kurve).
- C. Hybridisierungs-Sonden binden nicht perfekt an einen Einzelstrang des PCR-Produktes. Die Sondenbindungsstelle hat eine Fehlbasenpaarung (rotes Dreieck).
- D. Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur aus B. Für die perfekt passenden Sonden wird ein charakteristischer Schmelzpunkt erhalten (blaue Kurve), während das nicht perfekte Passen auf einem anderen DNA-Einzelstrang zu einer erniedrigten Schmelztemperatur führt (rote Kurve).

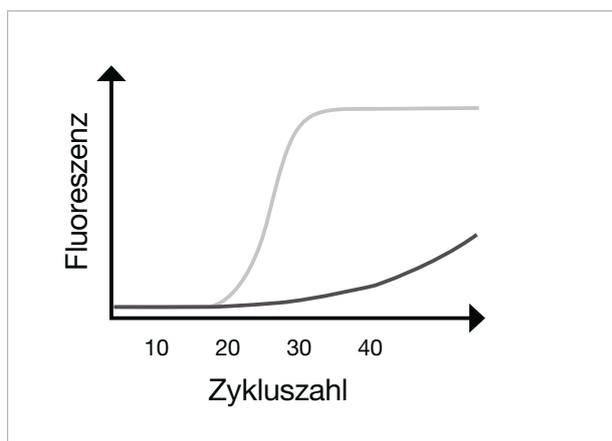


Abb. 61: Amplifikationskurven effizienter und ineffizienter PCR-Systeme

Amplifikationskurven einer Real-Time-PCR-Reaktion. Idealer Kurvenverlauf (hellgrau) und noch zu optimierender Kurvenverlauf (schwarz).

Literaturhinweise

BIEL, S. S., NITSCHKE, A., KURTH, A., SIEGERT, W., OZEL, M. & GELDERBLOM, H. R. (2004). Detection of human polyomaviruses in urine from bone marrow transplant patients: comparison of electron microscopy with PCR. *Clin. Chem.* 50, 306 – 312.

BRIESE, T., PALACIOS, G., KOKORIS, M., JABADO, O., LIU, Z., RENWICK, N., et al. (2005). Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 310 – 313.

ELAHI, E. & RONAGHI, M. (2004). Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis. *Methods Mol. Biol.*, 255, 211–219.

GENTILE, M. & GELDERBLOM, H. R. (2005). Rapid viral diagnosis: role of electron microscopy. *New Microbiol.*, 28, 1 – 12.

HAZELTON, P. R. & GELDERBLOM, H. R. (2003). Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 294 – 303.

HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6, 986 – 994.

IBRAHIM, M. S., KULESH, D. A., SALEH, S. S., DAMON, I. K., ESPOSITO, J. J., SCHMALJOHN, A. L., et al. (2003). Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3835 – 3839.

JINNO, Y., YOSHIURA, K. & NIICAWA, N. (1990). Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6739.

KULESH, D. A., BAKER, R. O., LOVELESS, B. M., NORWOOD, D., ZWIERS, S. H., MUCKER, E., et al. (2004). Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler and the Cepheid smart Cycler platforms. *J. Clin. Microbiol.* 42, 601 – 609.

KUTYAVIN, I. V., AFONINA, I. A., MILLS, A., GORN, V. V., LUKHTANOV, E. A., BELOUSOV, E. S., et al. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.*, 28, 655–661.

KWOK, S. & HIGUCHI, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237–238.

LOS, M., LOS, J. M., BLOHM, L., SPILLNER, E., GRUNWALD, T., ALBERS, J., et al. (2005). Rapid detection of viruses using electrical biochips and anti-virion sera. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40, 479–485.

MACKAY, I. M., ARDEN, K. E. & NITSCHKE, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.*, 30, 1292–1305.

MACKAY, I. M., ARDEN, K. E. & NITSCHKE, A. (2004). Real-time Fluorescent PCR Techniques to Study Microbial-Host Interactions. In T. Savidge, C. Pothulakis (Eds.), *Microbial Imaging. Methods in Microbiology*, vol. 34. (pp. 253–328). Amsterdam: Academic Press.

MACKAY, I. M. (ed.). *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. Chapter 9. Wymondham, UK: Caister Academic Press.

NAZARENKO, I., LOWE, B., DARFLER, M., IKONOMI, P., SCHUSTER, D. & RASHTCHIAN, A. (2002). Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.*, 30, e37.

NEBLING, E., GRUNWALD, T., ALBERS, J., SCHAFFER, P. & HINTSCHE, R. (2004). Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays. *Anal. Chem.*, 76, 689–696.

NITSCHKE, A., ELLERBROK, H. & PAULI, G. (2004). Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1207–1213.

NITSCHKE, A., STEGER, B., ELLERBROK, H. & PAULI, G. (2005). Detection of vaccinia virus DNA on the LightCycler by fluorescence melting curve analysis. *J. Virol. Methods*, 126, 187–195.

NITSCHKE, A., STEUER, N., SCHMIDT, C. A., LANDT, O. & SIEGERT, W. (1999). Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin. Chem.* 45, 1932 – 1937.

OLSON, V. A., LAUE, T., LAKER, M. T., BABKIN, I. V., DROSTEN, C., SHCHELKUNOV, S. N., et al. (2004). Real-Time PCR System for Detection of Orthopoxviruses and Simultaneous Identification of Smallpox Virus. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1940 – 1946.

PANG, J., MODLIN, J. & YOLKEN, R. (1992). Use of modified nucleotides and uracil-DNA glycosylase (UNG) for the control of contamination in the PCR-based amplification of RNA. *Mol. Cell Probes*, 6, 251 – 256.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., et al. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350 – 1354.

SCHNEEBERGER, C., SPEISER, P., KURY, F. & ZEILLINGER, R. (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl.*, 4, 234 – 238.

THELWELL, N., MILLINGTON, S., SOLINAS, A., BOOTH, J. & BROWN, T. (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.*, 28, 3752 – 3761.

TYAGI, S., BRATU, D. P. & KRAMER, F. R. (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.*, 16, 49 – 53.

VANDESOMPELE, J., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. (2002). Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal. Biochem.*, 303, 95 – 98.

WITTWER, C. T., RIRIE, K. M., ANDREW, R. V., DAVID, D. A., GUNDRY, R. A. & BALIS, U. J. (1997). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22, 176 – 181.