

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Strahlenbiologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Göhde

**Nachweis latenter CMV-Infektionen durch die Kombination
von Mikropartikeltechnologie und Durchflußzytometrie**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Oguntke, Karin Sabine

Bielefeld

2006

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. N. Wedemeyer

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. E. Severin

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Strahlenbiologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Göhde
Referent: Priv.-Doz. Dr. N. Wedemeyer
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. E. Severin

ZUSAMMENFASSUNG

Nachweis latenter CMV-Infektionen durch die Kombination von Mikropartikeltechnologie und Durchflußzytometrie

Oguntke
Karin Sabine

Molekulare epidemiologische Untersuchungen (z.B. hinsichtlich individueller Strahlenempfindlichkeit oder strahlenassoziiertem Krebs) erfordern sowohl hochempfindliche und zuverlässige Diagnostikverfahren als auch den Einsatz automatisierter Systeme, die eine parallele Aufbereitung und Analyse zahlreicher Proben ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde ein durchflußzytometrisches Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von PCR-Produkten entwickelt. Dabei werden die Amplifikate durch Primer markiert, die mit Digoxigenin und Biotin konjugiert sind. Die PCR-Produkte werden mit Mikropartikeln inkubiert, die mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern gekoppelt sind, und gleichzeitig mit Streptavidin-Phycoerythrin Fluoreszenz-markiert. Die Fluoreszenzintensität jedes Partikels und damit auch der Gehalt an gebundenem PCR-Produkt werden im Durchflußzytometer bestimmt.

Die hohe Empfindlichkeit des Verfahrens sollte genutzt werden, um latente Infektionen mit dem Zytomegalie-Virus (CMV) zu analysieren. Für den benötigten Nachweis weniger Virengenomäquivalente im peripheren Blut wurde ein spezielles Protokoll zur DNA-Isolierung aus Monozyten erarbeitet, das auf der Verwendung magnetischer Mikropartikel basiert. Im Vergleich mit einem etablierten PCR-Verfahren zeigte das Nachweissystem bei 110 untersuchten Blutproben eine Steigerung der Spezifität.

Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichen, dass die Kombination von Mikropartikeltechnik und Durchflußzytometrie eine Reihe hochempfindlicher und vollständig automatisierbarer Messungen ermöglicht.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2006

*Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster*

Gewidmet meiner lieben Familie

In Christus liegen verborgen alle Schätze der Weisheit und der Erkenntnis.

Kolosser 2,3

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG: GRUNDLAGEN DER ZYTOMEGALIE	1
1.1	Erreger	1
1.2	Epidemiologie	1
1.3	Übertragung und Infektion	2
1.4	Pathogenese und Symptome	3
1.5	Prävention und Therapie	5
1.6	Bisherige Diagnostik	7
1.7	Durchflußzytometrische Analyse	12
1.8	Ziel der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODE	17
2.1	Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	17
2.1.1	Nested PCR	19
2.2	verwendete Substanzen	19
2.2.1	Mikropartikel	19
2.2.2	Enzyme	19
2.2.3	Oligonukleotide (PCR-Primer)	20
2.2.4	Oligonukleotid-Markierungen	21
2.2.5	Nukleinsäure-Längenstandard	21
2.3	DNA-Isolierung	22
2.3.1	DNA aus Lymphozyten	22
2.3.2	DNA aus Monozyten	24
2.4	Photometer	25
2.5	PCR und Gelelektrophorese	26
2.6	Aufreinigung, Färbung und Anheftung der PCR-Produkte an Beads	27

3	ERGEBNISSE	29
3.1	Etablierung der durchflußzytometrischen Analyse von CMV-PCR-Produkten	29
3.1.1	Etablierung einer CMV-spezifischen PCR	29
3.1.2	Verbesserung der Nachweiseffizienz durch Einsatz einer nested-PCR	31
3.1.3	Verhinderung der Entstehung von Primerdimeren	32
3.1.4	Etablierung der durchflußzytometrischen Messung	33
3.2	Analyse von latenten CMV-Infektionen in Blutproben	35
3.2.1	Beschreibung des Probenmaterials	35
3.2.2	Beschreibung der Aufarbeitungsmethode	35
3.2.3	Ergebnisse der UL93-PCR	40
3.2.4	Ergebnisse des durchflußzytometrischen Verfahrens	40
3.2.5	Statistische Auswertung	42
3.3	Isolierung der CD14-positiven Zellen zur Optimierung der CMV-PCR-Effizienz	46
4	DISKUSSION	49
4.1	Schwieriger Nachweis latenter CMV-Infektionen	49
4.2	Steigerung der Sensitivität	51
4.2.1	DNA-Isolierung	51
4.2.2	DNA-Analyse	52
4.3	Weitere Anwendungsbereiche	56
	LITERATUR	57

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Enzymimmunoassay
- Abb. 2:** Die einzelnen Schritte in einem Zyklus der PCR-Reaktion
- Abb. 3:** PCR unterschiedlicher Mengen an CMV-DNA
- Abb. 4:** Vergleich unterschiedlicher PCR-Bedingungen (Anzahl der Vorzyklen)
- Abb. 5:** Bildung von Primerdimeren während der PCR
- Abb. 6:** Schematische Darstellung der durchflußzytometrischen Methode zur Messung von PCR-Produkten
- Abb. 7:** Histogramm einer durchflußzytometrischen Analyse
- Abb. 8:** Durchflußzytometrische Analyse serologisch positiver und negativer Blutproben
- Abb. 9:** Untersuchung von 110 Blutspendern auf latente CMV-Infektion mit der nested gH-PCR und anschließender Durchflußzytometrie
- Abb. 10:** Darstellung einer auf den Einsatz von Mikropartikeln beruhenden, voll automatisierbaren Methode zum durchflußzytometrischen Nachweis von CMV-Genen in Blutproben
- Abb. 11:** Vergleichende PCR mit DNA aus Leukozyten und Monozyten eines latent CMV-infizierten Probanden

1 Einleitung: Grundlagen der Zytomegalie

1.1 Erreger

Das Cytomegalievirus (CMV) gehört der Herpesviridae-Familie (Untergruppe B) an und wird als humanes Herpesvirus Typ 5 (HHV-5) bezeichnet.

Es hat einen Durchmesser von 150-200 nm und enthält lineare, doppelsträngige DNA mit ca. 230.000 Basenpaaren, die von einem ikosaedrischen Kapsid und einer als Tegument bezeichneten Proteinschicht umschlossen wird. Die äußere Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelmembran, in die mindestens acht verschiedene Glykoproteine eingelagert sind, mit deren Hilfe das Virus mit der Wirtszelle fusioniert. Sein Name 'Zytomegalie-Virus' deutet darauf hin, dass es eine Vergrößerung der infizierten Zelle bewirkt.

1.2 Epidemiologie

CM-Viren sind ubiquitär nachweisbar und neigen stark zur Latenz, so dass nur ein geringer Anteil der Infektionen klinisch manifest wird. Wie beim Menschen sind die Viren auch bei Tieren streng wirtsspezifisch.

Zytomegalie ist die häufigste konnatale Infektion sowie die häufigste und wichtigste Infektion bei organtransplantierten Patienten, bei denen das höchste Risiko 1-4 Monate nach der Immunsuppression besteht. Eine CMV-Pneumonie tritt bei ca. 20 % der Empfänger von Knochenmarkstransplantaten auf, die Letalität beträgt dabei nahezu 90 %.

Das Auftreten spezifischer Antikörper gegen CMV hängt vom sozioökonomischen Standard eines Landes ab, wobei die Prävalenz in Industriestaaten niedriger als in

ärmeren Ländern ist. In Europa sind etwa 40-70 % der Bevölkerung Antikörper-positiv gegenüber CMV, in Ländern der dritten Welt sogar mehr als 90 %.

„In der Bundesrepublik sind ca. 50 % der Erwachsenen CMV-infiziert, in Ländern mit schlechten sozioökonomischen Bedingungen bis zu 98 %. Die Durchseuchung erfolgt zweigipfelig vorzugsweise in der frühen Kindheit und im Adoleszentenalter mit der Aufnahme sexueller Beziehungen“ (Oethinger 1997, S. 182).

Insgesamt nimmt die Durchseuchung der Bevölkerung mit dem Lebensalter zu. In besonderen Risikogruppen (z.B. AIDS-Patienten, Prostituierte und Homosexuelle) sind ca. 90 % seropositiv. Das in diesem Patientenkreis am häufigsten vorkommende Herpesvirus war CMV, und zwar vorwiegend bei Personen mit niedrigem CD4-Zellen-Status. Aufgrund dessen kann man vermuten, dass das Virus im Zusammenhang mit starker Immunsuppression reaktiviert wird (Fabio et al. 1997, S. 2658).

Die Tatsache, dass das CMV nicht nur bei seropositiven Menschen, sondern auch bei seronegativen reproduzierbar nachgewiesen werden konnte, lässt darauf schließen, dass CMV-Infektionen weiter verbreitet sind als bisher durch seroepidemiologische Studien angenommen wurde (Taylor-Wiedemann et al. 1991).

1.3 Übertragung und Infektion

Je nach Infektionszeitpunkt unterscheidet man die konnatale (prä-, peri-) und postnatale Infektion.

Erstere Form ist die häufigste angeborene Virusinfektion: das Virus wird diaplazentar übertragen (vertikale Übertragung). Bei den Müttern finden sich meistens asymptomatische Verläufe oder leichte, uncharakteristische Infekte. Trotzdem kommt es bei ihnen zur Virämie und damit zur intrauterinen Infektion des Kindes. Eine in den ersten sechs Monaten der Gravidität manifest auftretende Infektion kann schwere Embryonalschäden sowie eine Frühgeburt verursachen (s.u.).

Letztere wird durch Tröpfchen- und Schmierinfektion verbreitet, wobei Bluttransfusionen, Organtransplantationen und Geschlechtsverkehr besondere Risikofaktoren darstellen. Außerdem wird das Virus über Urin, Speichel, Tränenflüssigkeit, Sperma, Cervix-Sekret und Stuhl ausgeschieden (horizontale Übertragung).

Bei Herpesviren unterscheidet man den lytischen Infektionszyklus und die Latenz, die zur lebenslangen Infektion des Organismus führt. „Cytomegalovirus latency depends on an interaction with hematopoietic cells in bone marrow and peripheral blood“ (Slobedman/Mocarski 1999, S. 4608).

Das Virus persistiert nach Primärinfektion im Körper und kann bei geschwächtem Immunsystem reaktiviert werden. Deshalb manifestiert sich die Infektion besonders bei abwehrgeschwächten Patienten im Rahmen maligner Krankheiten (z.B. Leukämie, M. Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphomen), Immunschwäche (z.B. AIDS) und Immunsuppression infolge von Transplantationen.

Unterschieden werden muß zwischen der räumlich begrenzten Latenz und jener im gesamten Organismus. Momentan noch umstritten ist die Frage, ob gleichzeitig in einem Organ molekulare Latenz und in einem anderen eine produktive Infektion oder gar beide in demselben Organ vorkommen. Ferner bestehen indirekte Hinweise, dass sich die Schießscheibenzellen (Targetzellen) bezüglich produktiver Infektion von denen mit Latenz unterscheiden (Kurz et al. 1997, S. 2986).

1.4 Pathogenese und Symptome

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass neutralisierende Antikörper einen modulatorischen Einfluß auf die Infektion und den Krankheitsverlauf ausüben. Während der Reaktivierung einer latenten Viruspersistenz beschränken sie die Ausbreitung der Viren im Körper. Dieser Effekt ist abhängig vom vorhandenen Antikörpertiter (Schoppel et al. 1998, S. 1241).

Die Erkrankung kann verschiedene Organe betreffen, wobei vorwiegend die Lunge, Leber, Nieren, Nebennieren, Speicheldrüsen, Augen und das ZNS betroffen sind.

Eine CMV-Infektion verläuft gewöhnlich asymptomatisch, sie kann aber auch ein mononukleose-ähnliches Krankheitsbild bei immunsupprimierten Personen sowie eine angeborene Infektion Neugeborener verursachen (Allen et al. 1995, S. 725).

90-95 % der konnatalen Infektionen verlaufen symptomlos, während bei den übrigen 5-10 % Frühgeburten, chronische Hepatopathien mit prolongiertem Ikterus, Hepatosplenomegalie, hämolytische Anämie, thrombozytopenische Purpura, Schwerhörigkeit, Chorioretinitis, Wachstumsretardierung mit Skelettveränderungen, zerebrale Defizite u.a. auftreten können. Intrakranielle Verkalkungen liegen im Gegensatz zur Toxoplasmose meist periventrikulär. Krämpfe und ein Hydrozephalus können auf eine Enzephalitis hinweisen.

Auch die postnatale Infektion bei immunkompetenten Patienten verläuft in mehr als 90 % der Fälle stumm. Es kann zu Müdigkeit, einem mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild mit Lymphadenopathie oder leichter Hepatitis kommen.

Wenn aufgrund anderer schwerer Allgemeinerkrankungen eine bedeutende Resistenzminderung besteht, können auch Erwachsene von schweren CMV-Erkrankungen betroffen sein. Dies gilt besonders für Immunsupprimierte oder AIDS-Patienten, bei denen die Erkrankung einen dramatischeren Verlauf nimmt: Fieber, mononukleose-ähnliches Krankheitsbild, Myalgien, Arthralgien, Leukopenie, Thrombozytopenie, Retinitis, Enzephalitis, interstitielle Pneumonie (mit hoher Letalität), Ösophagitis, Gastritis, Colitis mit Ulcerationen, Hepatitis u.a.

Durch den Mangel an T4-Zellen kommt es bei AIDS-Patienten zu einer Reihe von opportunistischen viralen Infekten. Besonders gefürchtet ist die Chorioretinitis, die durch CMV verursacht wird und als häufigste Ursache für eine Erblindung bei AIDS-Patienten gilt.

Bezüglich der Pathologie handelt es sich bei der CMV-Infektion um eine interstitielle lymphoplasmazelluläre Entzündung, die durch das Vorkommen von Riesenzellen mit Kern- und Zytoplasmaeinschlusskörperchen ('Eulenaugenzellen') gekennzeichnet ist. Dabei finden sich Nekrosen sowie Metaplasien verschiedener Gewebe und Organe.

Ferner besteht eine Leukopenie mit relativer Lymphozytose und atypischen Lymphozyten, eventuell zusätzlich eine Thrombozytopenie (s.o.). Das Virus befällt vorwiegend adhärente und CD14-positive Zellen (Dumont u.a. 2001, S. 3643). Das Oberflächenantigen CD14 wird von Monozyten und von Makrophagen, die von diesen abstammen, exprimiert.

Dadurch ruft die CMV-Infektion eine zusätzliche zelluläre Immunsuppression hervor, die weitere Infektionen begünstigt (z.B. Klebsiellen, Legionellen, Aspergillus, Candida). So tritt die Zytomegalie oft kombiniert mit anderen Erkrankungen auf (z.B. Pertussis). Myokarditis, Kreislaufschock, Hyperparathyreoidismus sowie Hörsturz sind mögliche Komplikationen. Ist der Darm betroffen, kann es dort zu Perforationen kommen. Es besteht zudem der Verdacht, dass das CM-Virus onkogen wirkt.

1.5 Prävention und Therapie

Prophylaxe und Frühtherapie sind zwei Möglichkeiten, um Transplantat-Empfänger mit hoher Sicherheit vor dem Ausbruch einer CMV-Erkrankung zu schützen.

Im Rahmen der Transfusionsmedizin ist vor allem die Leukozytendepletion von großer Bedeutung. In den gewonnenen Blutprodukten findet vor ihrer Übertragung auf den Empfänger eine Abreicherung von Leukozyten statt, um die Infektionsgefahr zu minimieren. Transplantierte Patienten ohne Zytomegalie, aber mit einem sehr großen Erkrankungsrisiko können vorbeugend medikamentös behandelt werden, um dies fast auszuschließen und einen milden Krankheitsverlauf zu erreichen. Eine andere Möglichkeit besteht in regelmäßigen Blutuntersuchungen (s.u.), die eine Virusvermehrung bereits nachweisen, bevor die Symptome einer Erkrankung auftreten. "The availability of microbiologic methods that detect early replication of cytomegalovirus (CMV) posttransplantation will enhance the process of initiating preemptive antiviral therapy prior to the appearance of CMV disease" (Mendez et al. 1997, S. 526).

Das frühe Erkennen einer Zytomegalie-Virämie ist besonders wichtig, weil die antivirale Therapie darauf basiert und zudem die Überwachung der Effizienz einer Prophylaxe davon abhängt (Toyoda et al. 1995, S. 1272).

Nach Einleitung einer 14-tägigen konsequenten Therapie (Frühtherapie) tritt nur noch in Ausnahmefällen eine Erkrankung auf.

Bei betroffenen Neugeborenen führt man Austauschtransfusionen durch, sofern eine Bilirubinämie über 342 $\mu\text{mol/l}$ vorliegt.

Eine symptomatische CMV-Infektion immuninkompetenter Patienten wird durch Ganciclovir oder Foscarnet behandelt. Da diese Therapie lediglich eine Unterdrückung der Virusvermehrung, jedoch keine Elimination des Virus bewirkt, sind Rezidive nicht ausgeschlossen. Die Möglichkeit einer aktiven Immunisierung besteht bislang nicht, die Wirksamkeit von Immunglobulinen erscheint insgesamt fraglich und nur auf wenige Situationen begrenzt (Oethinger 1997, S. 182).

Ganciclovir wird bei Retinitis, Kolitis, Pneumonie und anderen Manifestationen Erwachsener eingesetzt: Die rechtzeitige Behandlung einer CMV-Infektion kann das Risiko einer ernsten Erkrankung signifikant reduzieren. Deshalb ist eine frühe Diagnose und eine korrekte Differenzierung von Abstoßungsreaktionen von großer Bedeutung, besonders seitdem das antivirale Mittel Ganciclovir zur Verfügung steht (Tanabe et al. 1996, S. 1508).

Dabei sind allerdings schwerwiegende Nebenwirkungen des Medikaments auf das Knochenmark zu bedenken: So erwies sich prophylaktisch verabreichtes Ganciclovir zwar als effektiv bei der Unterdrückung von CMV-Infektionen und -Erkrankungen, aber es führte zu Neutropenie und vermehrten bakteriellen Infektionen (Gerna et al. 1995, S. 675).

Der therapeutische Einsatz von Foscarnet kann unerwünschte Wirkungen im Gastrointestinaltrakt, ZNS und in den Nieren hervorrufen.

Die parenterale Applikation und die geschilderten Nebenwirkungen der eingesetzten Medikamente erfordern eine stationäre Behandlung.

1.6 Bisherige Diagnostik

Aufgrund der oben dargestellten Sachverhalte bezüglich der Zytomegalie lässt sich die Frage, warum die CMV-Diagnostik wichtig ist, klar beantworten:

In erster Linie spielt sie im Rahmen der Transfusions- und Transplantationsmedizin eine entscheidende Rolle.

Hierbei ist besonders der Fall herauszustellen, in dem einem Empfänger, der bisher noch keinen Kontakt mit CMV hatte, infiziertes Blut oder ein entsprechendes Organ übertragen würde. Die Infektion hätte für diesen Patienten fatale Folgen (s.o.), weil er vor allem bei einer Immunsuppression ein hohes Erkrankungsrisiko besitzt.

Zum Nachweis des Cytomegalievirus stehen verschiedene virologische, serologische und molekulargenetische Verfahren (monoklonale Antikörper gegen CMV-Antigene, Nukleinsäure-Hybridisierung, PCR) zur Verfügung:

- Riesenzellen lassen sich mikroskopisch in Urin, Speichel und Liquor nachweisen.
- Virusnachweis in Urin, Sperma, Zervixsekret, Blut (Leukozyten): erfolgt auf Gewebekulturen von menschlichen Fibroblasten aus Haut und Muskulatur. Am besten geeignet ist die Virusisolierung aus Lungengewebe.
- Serologischer Nachweis der Antikörper mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion oder des Neutralisationstestes: Beweisend ist jedoch nur ein Titeranstieg um vier Stufen.
- DNA-Hybridisierung
- Polymerase-Ketten-Reaktion: Bei positiver CMV-PCR im Liquor ist von einer aktiven CMV-Erkrankung des ZNS auszugehen.

Die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methoden werden erläutert und gegenübergestellt.

Tabelle: Vor- und Nachteile verschiedener diagnostischer Verfahren

CMV-Diagnostik	Vorteile	Nachteile
1. immunhistochemisch (Goldstandard)	sehr genau	sehr arbeitsaufwendig
2. immunologisch (ELISA) Nachweis CMV-spez. IgMs Nachweis v. CMV-Antigenen	schnell und einfach	kein Nachweis bei Frischinfizierten (Latenzzeit), kaum Unterscheidung möglich zwischen latent vorhanden und erkrankt (Reaktivierung), Bestimmung des Virentiters nicht möglich
3. genetisch Hybridisierung PCR (meist ELISA-PCR)	hochspez. Nachweis sowie Quantifizierung des Virentiters	schwierige Tests wegen geringer Virenkopienzahlen bei Latenten

1. Mit dem so genannten Goldstandard der Virologie kann die Infektion während der ersten drei Lebenswochen im Urin, Speichel oder Blut nachgewiesen werden. Der Nachweis gelingt sehr zuverlässig, ist aber auch recht arbeitsintensiv.
2. Nach der Infektion treten im Serum neutralisierende und komplementbindende Antikörper auf, so dass der Infektionsstatus durch den Nachweis von CMV-spezifischen IgM- oder IgG-Antikörpern festgestellt wird. Dieser Test wird mit Hilfe von Enzymimmunoassay (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay, ELISA) durchgeführt, wobei entweder die CMV-spezifischen Antikörper oder die CMV-Antigene nachgewiesen werden. Letzteres ist aufgrund der geringen Mengen CMV-spezifischer Proteine im peripheren Blut eines nicht erkrankten Menschen äußerst schwierig. Ferner gilt die Interpretation dieser Werte bei Immunsupprimierten als problematisch (Schmidt et al. 1995, S. 1137).

Bei diesem Verfahren wird beispielsweise eine definierte Menge enzymmarkiertes Antigen (Tracer) mit dem zu bestimmenden Antigen in einem mit spezifischen Antikörpern beschichteten Teströhrchen versetzt, worauf sich Antigen-Antikörper-Komplexe und enzymmarkierte Ag-Ak-Komplexe ausbilden. Nach Ausspülen des überschüssigen Tracers wird die Aktivität der enzymmarkierten Ag-Ak-Komplexe durch eine entsprechende Reaktion gemessen.

Diese Enzymaktivität verhält sich umgekehrt proportional zum Antigengehalt der Probe: Eine geringe Aktivität bedeutet eine hohe Menge des nachzuweisenden Antigens.

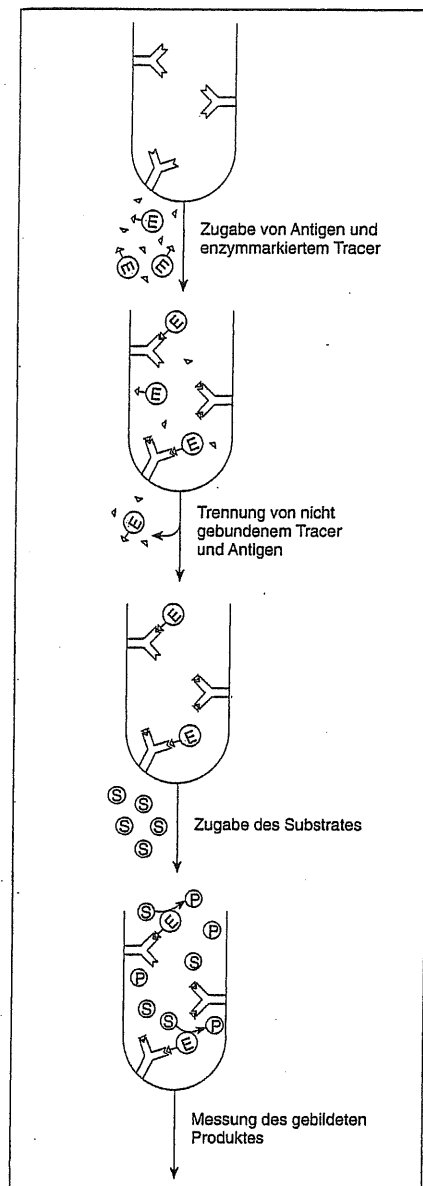


Abb. 1: Enzymimmunoassay (Gödde 1997, S. 149)

Dieses Verfahren ist rasch und leicht durchführbar, kann aber nur Auskunft darüber geben, ob die betreffende Person mit dem Virus in Kontakt gekommen ist, und nicht, ob eine tatsächliche Infektion vorliegt. Eine Unterscheidung zwischen latent vorhandenen Viren und erkrankten Personen, bei denen es zu einer Reaktivierung gekommen ist, kann damit kaum gelingen. So besteht mit diesem Verfahren keine Kontrolle über die Reaktivierung. Wegen einer Latenzzeit von drei Wochen ist der Nachweis zudem bei Frischinfizierten nicht erfolgversprechend.

3. Neben dem Nachweis von weißen Blutkörperchen, die Eiweißverbindungen von CMV auf ihrer Oberfläche tragen und damit auf eine CM-Virämie deuten, steht auch die Messung der CM-Viruslast anhand der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Verfügung. Der direkte Nachweis einer Virusinfektion vor der Serokonversion kann jedoch nur über den Antigen-Nachweis in Leukozyten (pp65) mittels Virusisolierung oder nested-PCR erfolgen.

Bei der PCR werden Spuren der CMV-DNA sehr stark vervielfältigt und anschließend mit einer Gelelektrophorese bestimmt (s. 2.1). Die Methode wird in vielen Bereichen angewendet: Neben bakteriellen und viralen Infektionen in der medizinischen Diagnostik werden Erbkrankheiten sowie Verwandtschaftsbeziehungen in der humangenetischen Diagnostik mit Hilfe dieses Verfahrens nachgewiesen. In der Rechtsmedizin spielt der 'genetische Fingerabdruck' eine immer bedeutendere Rolle, während man sich in der modernen Humangenetik zumeist mit Mutationen und Klonierung von Genen beschäftigt.

“The detection of CMV by DNA amplification techniques (PCR) provides the potential for rapid and early diagnosis. PCR is able to selectively amplify and detect specific CMV DNA” (Mendez et al. 1997, S. 526).

Mit der PCR können selbst wenige Viren in einer Blutprobe nachgewiesen werden. Die geringe Anzahl von Virenkopien bei latent infizierten Personen setzt der Vorgehensweise jedoch auch technische Grenzen, so dass eine gewisse Unsicherheit bleibt:

„Der Virusnachweis klärt jedoch nicht, ob eine primäre Infektion oder eine Reaktivierung vorliegt, da eine Virusausscheidung nach Infektion lange Zeit (Monate evtl. Jahre) bestehen kann. Spezifische IgM-Antikörper sind ein guter Hinweis auf eine Infektion. Der Antikörperanstieg kann jedoch bei immunsupprimierten Patienten unterbleiben. Biopsie- oder Sektionsmaterial wird histologisch auf 'Eulenaugen' untersucht. Der positive Nachweis ist diagnostisch verwertbar, jedoch lässt sich eine Infektion durch einen negativen Befund nicht ausschließen“ (Alexander/Raettig 1998, S.73).

Die Tatsache, dass ein Antikörperanstieg bei Immunsupprimierten fehlen kann, erlaubt allerdings eine bessere Quantifizierung des Virentiters über die PCR, die einen hochspezifischen Nachweis darstellt (s.u.).

Eine frühe Diagnose ist entscheidend für die Patientenführung und antivirale Therapie, um die Morbidität und Mortalität infolge von CMV-Infektionen zu reduzieren. Bei einem Vergleich von CMV-Nachweismethoden erwies sich die Sensitivität und Spezifität mit der PCR als deutlich höher als für IgM-ELISA (Schmidt et al. 1995). Immunologische und genetische Methoden verbessern zwar die Diagnostik, sie haben aber auch jeweils Nachteile, die ihren Einsatz limitieren (Barber et al. 1999, S. 85ff).

1.7 Durchflußzytometrische Analyse

Neben der konventionellen Beurteilung von PCR-Produkten mit Hilfe der Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid, die sehr arbeitsintensiv und für eine Automatisierung kaum geeignet erscheint, sind weitere Arbeitsmethoden beschrieben worden, die sich auch für den Hochdurchsatz eignen.

Eine Möglichkeit des besonders sensitiven Nachweises besteht in der Kombination von PCR und anschließender Durchflußzytometrie. Das Durchflußzytometer stellt ein optisches Messgerät dar, das Tausende von Partikeln pro Sekunde analysieren kann und dessen Bedienung weitgehend Computer-gesteuert ist.

Die automatisierte Analyse der optischen Charakteristika von Proben im Durchfluß wurde 1969 in Deutschland und den USA entwickelt, beinhaltet eine Weiterentwicklung des Prinzips der Fluoreszenzmikroskopie und wird weitgehend genutzt, um Eigenschaften von Zellen und Mikropartikeln zu untersuchen.

Eine Fluoreszenzmarkierung erfolgt durch Bindung entsprechender Farbstoffe oder mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern. Als Lichtquelle dient ein Laser, dessen Strahl durch Linsensysteme in eine elliptische Form gebracht und von der zu analysierenden Probe (Sample) im rechten Winkel gekreuzt wird. Das System führt die Probe aus einem Röhrchen durch den Laserstrahl, wobei sie von einem äußeren Hüllstrom (Sheath Fluid) durch dessen höheren Druck zu einem sehr dünnen Flüssigkeitsfaden ausgezogen wird.

Durch den Laser wird die Probe zur Fluoreszenz angeregt. Resultierendes Fluoreszenz- und Streulicht werden von mehreren Lichtdetektoren aufgefangen und nach Intensität und Farbe getrennt vom Computer aufgezeichnet. Anhand ihrer spezifischen

Streulichtsignale können Größe und Komplexität bestimmt werden. Vom Messpunkt aus kann in verschiedenen Raumwinkeln Streulicht in der Anregungswellenlänge registriert werden.

Das von der Probe in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird vom Forward-Scatter-Detektor (FSC für Größe), das Seitwärtsstreulicht (SSC für Granularität) und verschiedene Fluoreszenzfarben rechtwinklig zum Laserstrahl aufgenommen und durch ein Objektivsystem, verschiedene Farbfilter und Teilerspiegel auf die verschiedenen Detektoren gelenkt. Auf diese Weise wird jeweils eine charakteristische Kombination von optischen Eigenschaften registriert, die eine spätere Auswertung ermöglicht. Die aufgezeichneten optischen Ergebnisse (Streu- und Fluoreszenzlicht) lassen Rückschlüsse auf bestimmte Charakteristika der gemessenen Probe zu. So korreliert das Vorwärtsstreulicht mit der Größe und dem Brechungsindex des Partikels, das Seitwärtsstreulicht mit der Struktur.

Durch die Geometrie des Küvettenhohlraums werden Kräftevektoren erzeugt, die asymmetrische Partikel zu einer Ausrichtung in seiner Längsachse veranlassen. Nach Verstärkung können die Signale im Computer erfasst und dargestellt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Orientierung in der Längsachse sind die Signale variabel, so dass eine breite Verteilung in der Dot-Plot-Darstellung am Computer resultiert (Punktwolke).

In der klinischen Diagnostik hat sich die Durchflußzytometrie inzwischen zu einem essentiellen Bestandteil entwickelt. Zu ihren bedeutendsten Anwendungsgebieten gehört die Immunophänotypisierung, z.B. von Zellen des hämatopoetischen Systems durch Einsatz Fluoreszenz-konjugierter Antikörper gegen Zelloberflächenproteine (Brown/Wittwer, 2000) sowie die Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts von Tumorzellen nach Fluoreszenzfärbung der DNA (Schumann et al., 1971).

Neben der Analyse von Zellen lassen sich mit diesem Verfahren Mikropartikel mit Größen von 0,5 bis 100 μm messen. Zunächst wurden sie zur Untersuchung der Phagozytose von Makrophagen (Steinkamp et al., 1982) und als Standard für Zellzählungen (Stewart/Steinkamp, 1982) eingesetzt. Nach der Entwicklung von Methoden, Antikörper kovalent an Mikropartikel zu binden, ließen sich auch Moleküle (z.B. Proteine) spezifisch abfangen und im Durchflußzytometer analysieren.

Seit einigen Jahren wird die Kombination von Mikropartikeln und Durchflußzytometrie auch zur Analyse von DNA- und RNA-Sequenzen verwendet. Durchflußzytometer verfügen über eine Auflösung von minimal 200 nm im Streulicht. Da PCR-Produkte jedoch deutlich kleiner sind (ein PCR-Produkt von 100 Bp hat eine Länge von ca. 35 nm), müssen die zu untersuchenden Teile vorher an kommerziell erhältliche Partikel mit nachweisbarer Größe gebunden werden (zumeist aus Latex oder Polystyrol). Für diesen Vorgang und die erforderliche Fluoreszenzmarkierung der PCR-Produkte gibt es jeweils verschiedene Möglichkeiten: Einerseits kann der Einbau direkt während der PCR durch Verwendung markierter Primer oder modifizierter Nukleotide erfolgen, andererseits indirekt durch Hybridisierung des Amplifikats mit einer markierten DNA-Sonde oder durch eine der PCR nachgeschalteten chemischen Modifikation des Produkts.

Meist spielt ein kompetitiver Hybridisierungsschritt eine wichtige Rolle, während dessen bestimmte Sequenzen keinen Gegenpart finden und anschließend mit Hilfe der Mikropartikel abgefangen werden (Brenner et al., 2000).

Auch alle Methoden, die PCR, Mikropartikel und Durchflußzytometrie kombinieren, weisen bisher einen solchen Hybridisierungsschritt auf. Dieser erhöht zwar die Spezifität und Zuverlässigkeit des Nachweises, verlängert aber das Verfahren und erschwert die Durchführung.

Erst in den letzten Jahren wurden Techniken entwickelt, die auf der Verwendung von paramagnetischen Beads basieren und eine Separation ermöglichen. PCR-Produkte viraler DNA oder RNA werden relativ einfach im Durchflußzytometer mit hoher Sensitivität getestet. Als Voraussetzungen für eine Messung im Durchflußzytometer sind verschiedene Punkte zu beachten, um Genfragmente (insbesondere PCR-Produkte) darstellbar und quantifizierbar zu machen (s. 3.1).

1.8 Ziel der Arbeit

Mit der Anzahl der Transplantationen stieg in den 90er Jahren auch die Anzahl der transplantationsbedingten CMV-Infektionen an. Obwohl der prophylaktische Einsatz antiviraler Medikamente wie Ganciclovir zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl der schweren und tödlichen Krankheitsverläufe nach transplantationsbedingten Infektionen geführt hat, haben diese Behandlungen aufgrund ihrer hohen Toxizität schwere Nebenwirkungen zur Folge. Die schonende Therapie CMV-erkrankter Patienten setzt die regelmäßige exakte Bestimmung des Virenstatus voraus.

Daher sind große Anstrengungen unternommen worden, um hochsensitive Verfahren zur Detektion von CMV-Viren zu entwickeln, mit denen der Infektionszustand von Spendern und Empfängern frühzeitig erfaßt und im Krankheitsfall das Virenvorkommen (viral load) im Rahmen der Therapie zuverlässig quantifiziert werden sollen (Monitoring). Die PCR ist als adäquate Methode zur absoluten CMV-Quantifizierung beschrieben worden, es bestehen aber große Differenzen der Ergebnisse unterschiedlicher Labore (Grundy et al. 1996, S. 1169).

Aufgrund der dargelegten Mängel in den bisher routinemäßig durchgeführten Untersuchungen, konnte keine sichere Aussage über den tatsächlichen CMV-Status gemacht werden. Ein genaueres Nachweisverfahren mit exakteren Ergebnissen ist wünschenswert. Die Entwicklung einer neuen CMV-Diagnostik und das Screening von Blutprodukten erfordern hoch standardisierte und quantitative Methoden.

Die PCR hat sich als ein wichtiges Instrument sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Diagnostik etabliert. Das Erkennen von CMV in Blutproben durch PCR ist das Ergebnis der Probenaufarbeitung, den Amplifikationsbedingungen und des Detektionsverfahrens (Krajden et al. 1996, S. 29). Aktuelle Systeme basieren auf der Detektion von Fluoreszenzsignalen und gewähren schnelle Ergebnisse und eine Quantifizierung (Nitsche et al. 1999, S. 1936).

Besonders die Annahme, dass CMV-Infektionen weiter verbreitet sind als bisher vermutet wurde (s. 1.2), stellt ein wichtiges Argument für den Einsatz des in dieser Arbeit angewendeten hochempfindlichen Analyseverfahrens dar. Wir streben eine

größere Sensitivität an, damit der Test auch eine Bestimmung von Proben mit geringer Viruslast zuläßt. Dies ist möglich durch die Kombination von Mikropartikeln und Durchflußzytometrie, wobei als Ausgangspunkt die Methode nach Wedemeyer et al. (2000) dient. In der vorliegenden Arbeit wird ein durchflußzytometrisches Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von PCR-Produkten erprobt und in seiner möglichen Anwendung dargestellt, mit dem sich der 'CMV-load' rasch, empfindlich und zuverlässig bestimmen läßt. Das Endziel besteht in der Etablierung eines automatisierbaren Verfahrens.

Als Untersuchungsobjekt werden Blutproben der Transfusionsmedizin hinsichtlich einer latenten CMV-Infektion mit der neuen Methode überprüft, wobei eine Optimierung der PCR angestrebt wird. Die Ergebnisse werden mit konventionellen Tests verglichen.

2 Material und Methode

2.1 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, die 1986 erstmals veröffentlicht wurde und für deren Entwicklung Karl Mullis 1993 den Nobelpreis der Chemie erhielt, ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Zielsequenzen. Mit ihr lassen sich in vitro solche DNA-Abschnitte schnell vermehren, von denen mindestens zwei kurze Teilsequenzen bekannt sind. Als Ausgangsmaterial genügen sehr geringe DNA-Mengen.

Die Verfügbarkeit gereinigter DNA-Polymerase und synthetischer Oligonukleotide ermöglichte diese Methode. Die Verwendung von temperaturstabiler DNA-Polymerase führte zu einer weitgehenden Automatisierung und auf diese Weise zu einem technischen Durchbruch. Die DNA-Polymerase des in heißen Quellen lebenden Bakteriums *Thermus aquaticus*, die so genannte 'Taq'-DNA-Polymerase, hat ihr Arbeitstemperatur-Optimum bei 75 °C und übersteht sogar etliche Erhitzungen auf 94 °C. Bei dieser Temperatur beträgt die Halbwertszeit der Aktivität ca. 30 Minuten.

Die Zielsequenz der Ausgangs-DNA (des Templates) wird während mehrerer Zyklen der Polymerase-Ketten-Reaktion vermehrt, indem ein Zyklus jeweils drei Schritte umfaßt:

1. *Denaturierung der DNA:*

Durch Erhitzen auf 94 °C wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt, um den Primern im nächsten Schritt ihre Anlagerung zu ermöglichen.

2. *Hybridisierung der Primer (Annealing):*

Bei niedriger Temperatur, die von der Länge und Sequenz der Primer abhängt (z.B. 61 °C), paaren zwei verschiedene kurze DNA-Oligonukleotide spezifisch an ihre komplementären Sequenzen, so dass sie als Starter für die DNA-Synthese dienen.

3. DNA-Synthese:

Die Taq-Polymerase beginnt bei 72 °C an den Primern mit der Synthese und verlängert die Nukleotidstränge, indem bei bestimmten Magnesiumchlorid- und Pufferkonzentrationen Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) miteinander verknüpft werden. Dieser Einbau wird erst bei Abbruch des Templates oder erneutem Beginn des Denaturierungsschrittes beendet.

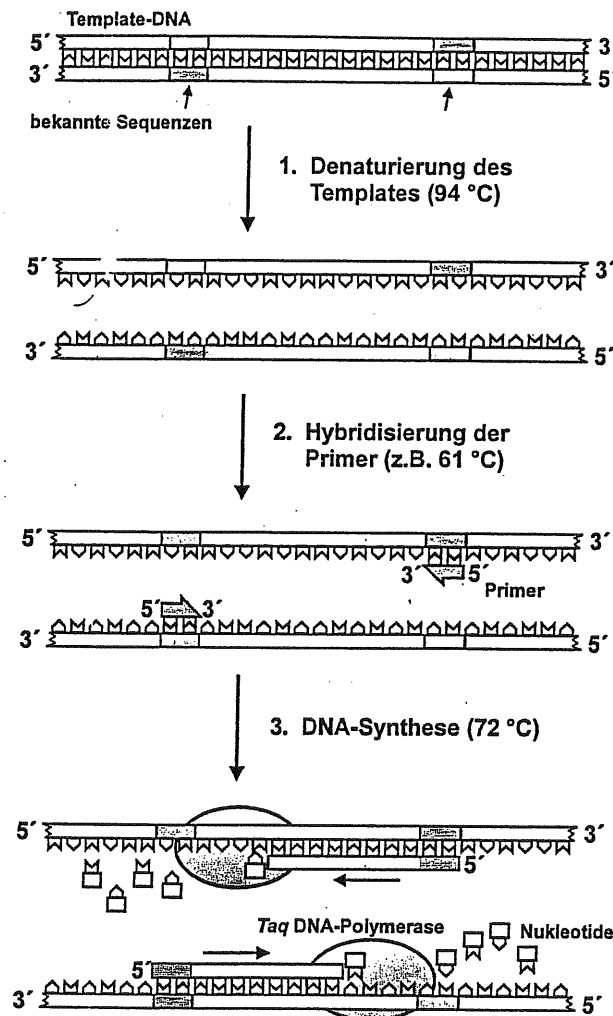


Abb. 2: Die einzelnen Schritte in einem Zyklus der PCR-Reaktion
(Physiologisch-chemisches Praktikum 1998)

Je nach Bedarf können in unterschiedlichen Programmen z.B. 20 oder 40 Zyklen gewählt werden. In jedem einzelnen Zyklus wird die Anzahl der von zwei Oligonukleotiden (Primern, s.u.) flankierten DNA-Sequenz verdoppelt, so dass es zu einer exponentiellen millionenfachen Vervielfältigung kommt.

2.1.1 Nested-PCR

Die nested-PCR stellt ein doppeltes PCR-Verfahren dar, bei dem zwei verschiedene Primerpaare verwendet werden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge bei verschiedenen Temperaturen an die DNA anlagern.

Auf diese Weise sind in einem Ansatz zwei Reaktionsschritte hintereinandergeschaltet. Im ersten Schritt wird die DNA bereits in 5-10 Zyklen vervielfältigt, bevor in dem zweiten die nested PCR mit innen liegenden kürzeren Primern in 35-40 Zyklen abläuft.

„Despite its low correlation to viremia and virus isolation from any site, nested PCR from organic DNA extracts of serum or plasma is the most sensitive diagnostic tool of an ongoing HCMV infection” (Hamprecht et al. 1997, S. 125).

Die Vorteile liegen in einer höheren Spezifität der doppelten PCR, der stärkeren Vervielfältigung der DNA-Fragmente und damit einer größeren Empfindlichkeit.

2.2 Verwendete Substanzen

2.2.1 Mikropartikel

Spezialisierung	Größe (µm)	Paramagnetisch	Firma
Anti-CD14	k.A.	+	Dynal
Anti-Digoxigenin	1	+	Roche Diagnostics
Silica	k.A.	+	Merck

k.A. = keine Angaben

2.2.2 Enzyme

Enzym	Firma
Proteinase K	Sigma
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen

2.2.3 Oligonukleotide (PCR-Primer)

Die zum Start der Polymerisation erforderlichen Primer müssen zum optimalen Ablauf einer Polymerase-Ketten-Reaktion folgende Kriterien erfüllen:

Sie sollen aus 20-30 Basen bestehen, wobei das Verhältnis von Adenin/Thymin zu Guanin/Cytosin ungefähr 1:1 beträgt und eine gleichmäßige Verteilung von A/Ts zu G/Cs vorliegt. Es dürfen keine repetitiven Sequenzen enthalten sein, die zu unspezifischen Anlagerungen führen, sowie keine palindromen Sequenzen wie z.B. GAGCTC, denn dadurch könnten sich Haarnadelstrukturen ausbilden, die den Ablauf der PCR stören. Ferner ist eine Vermeidung von G- oder C-Nukleotidwiederholungen (Blöcke) im 3'-Bereich zu beachten. Dieser sollte einen höheren Anteil an A/Ts enthalten.

Die Sequenz zwischen den Primerbindungsstellen sollte aus 50 Bp bis 2 kb bestehen. Beide Primer müssen etwa das gleiche Temperaturoptimum für die Anlagerung haben (Berechnung der Anlagerungstemperatur: G und C zählen 4 °C, A und T 2 °C). Die Primer sollten sich untereinander nicht anlagern können, da andernfalls Primerdimere entstehen, die die Effizienz der PCR herabsetzen.

Um den Nachweis verschiedener Gensequenzen zu vergleichen, wurden während der Untersuchungen unterschiedliche DNA-Fragmente mit ihren jeweiligen Primern getestet. Letztere besitzen weitestgehend die oben aufgeführten Eigenschaften (Wolf/Spector 1993).

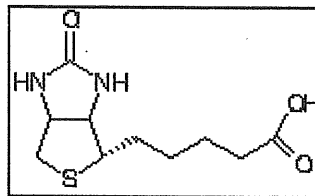
Tabelle: Verwendete PCR-Primer und ihre Eigenschaften

Primer	Sequenz (5'-3')	Anneal.-Temp.	Produktgröße	Veröffentlichung
GH 1f	CATCTTCCACGCGTACTCTTCA	72	922	-
GH 1g	GCATGGTAGATAGGATGGAGAG			-
GH 1e	CAAAGACTCGGACTTTCTCGAC	72	681	-
GH 1d	TACAGGTCGCTGAGGTATTCTG			-
GH 2s2	AGCCTCATCATCACCCAGACGGACA	72		-
GH 5as	GTCCACGACGACGTCAGTTACTTC	72		-

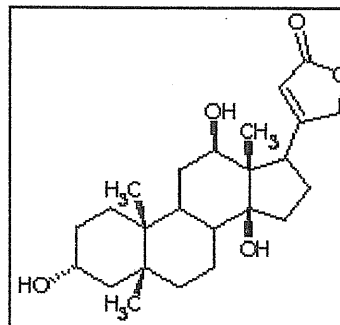
GH 3s	TGCTAGAATACGACGACACGCAAG	62		-
GH 7as	ACTTCCAGGACCGTACCGTT	62		-
UL93 IA	GGCAGCTATCGTGACTGGGA	60		Wolf et al. 1993
UL93 IB	GATCCGACCCATTGTCTAAG	60		Wolf et al. 1993
UL93 IIA	TTAGCGCGTGACCTGTTACG	60		Wolf et al. 1993
UL93 IIB	TCTAAGTTATTACGCAGTCCG	60		Wolf et al. 1993

2.2.4 Oligonukleotid-Markierungen

Biotin
(BIO)

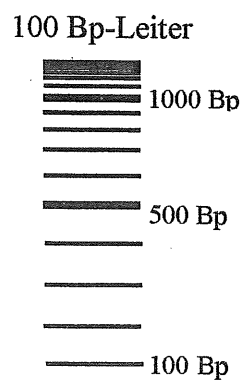


Digoxigenin
(DIG)



2.2.5 Nukleinsäure-Längenstandard

Da die Größe der verwendeten DNA-Abschnitte 50 bis 1500 Basenpaare beträgt, wurde folgender Längenstandard zu deren Untersuchung eingesetzt:



2.3 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:

- aus Vollblut: (zu geringe Kopienzahl)
- aus Lymphozyten: Gradientenzentrifugation / LSM-Methode
- aus Monozyten: magnetische Zellseparation mit CD14-Beads

2.3.1 DNA aus Lymphozyten

Die Lymphozyten werden durch Gradientenzentrifugation nach folgendem Protokoll gewonnen:

2 ml Vollblut (mit Heparin) sind mit 2 ml PBS zu mischen und vorsichtig in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen auf 3 ml Lymphocyte Separation Medium (LSM, ICN) zu geben. Es folgt eine Zentrifugation im Ausschwenkrotor (Heraeus) von 20 min bei 1600 rpm (400 • g).

Anschließend ist das gelbe Serum mit einer Pasteurpipette abzunehmen, bevor der Lymphozytenring abgezogen werden kann. (Zusätzlich abgenommenes Medium hat keine störenden Auswirkungen.)

Nach Überführen in ein frisches 15 ml-Zentrifugenröhrchen wird dieses auf ein Volumen von 15 ml mit PBS aufgefüllt und 10 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Danach kann der Überstand vorsichtig (aber vollständig) abgegossen werden, so dass die Zellen zur weiteren DNA-Isolierung zur Verfügung stehen.

2.3.1.1 DNeasy-Kit (Qiagen)

Die erhaltenen Lymphozyten werden in 200 μ l PBS aufgenommen, im Ausschwingrotor 3 min zentrifugiert (bei 400 \times g) und nach Abgießen des Überstandes zur DNA-Isolierung nach DNeasy (Qiagen) weiterverarbeitet:

Dazu ist das Zellpellet in 20 μ l Proteinase K und 200 μ l AL-Puffer zu resuspendieren. Da sich in den Röhrchen relativ viel Rücklauf angesammelt hat, nehmen wir 30 μ l statt 20 μ l Proteinase K. Es folgt ein Vortexen von 10 sec und ein Inkubieren von 10 min bei 70 °C im Thermoblock (Techne).

Nach der Lyse der Zellen und anschließender Zugabe von 200 μ l Ethanol absolut erfolgt ein weiteres Vortexen von 10 sec. Die Lösung wird dann auf eine DNeasy-Säule und nach einer Zentrifugation von 1 min in der Tischzentrifuge (Eppendorf, 8000 rpm) in ein neues 2 ml-Auffanggefäß gegeben. Nach Zufügen von 500 μ l AWS1-Puffer auf die Säule erfolgt eine weitere Zentrifugation von 1 min.

In einem neuen 2 ml-Auffanggefäß wird die mit 500 μ l AW2-Puffer versetzte DNeasy-Säule 3 min zentrifugiert (13000 rpm). Nach dem Abgießen der Flüssigkeit erfolgt noch einmal ein Trockenzentrifugieren von 1 min.

Jetzt wird die Säule zur Elution der DNA in ein frisches 1,5 ml-Auffanggefäß gegeben, in das zusätzlich 200 μ l AE-Puffer kommen. Nach Inkubation bei Raumtemperatur von 1 min folgt eine erneute Zentrifugation von 1 min (8000 rpm). Der Durchfluß wird noch einmal auf die Säule gegeben und 1 min zentrifugiert. (Anschließend ist die leere Säule zu entfernen.)

Die erhaltene DNA-Lösung kann bei einer Temperatur von 4 °C gelagert werden (nicht einfrieren!).

2.3.2 DNA aus Monozyten

CM-Viren befallen vorwiegend Monozyten, deren Anteil an der Gesamtzahl aller Leukozyten nur gering ist. Ferner ist davon auszugehen, dass lediglich ein kleiner Teil der Monozyten Viren trägt.

Tabelle: Mittelwerte und prozentuale Verteilung der Leukozytensubpopulationen bei gesunden Erwachsenen / Differentialblutbild (s. Hick 1997, S. 27)

	Mittelwert/ mm ³	% der Leukozyten
Neutrophile		
Granulozyten	4 200	60
Stabkernige	280	4
Segmentkernige	3 920	56
Eosinophile		
Granulozyten	210	3
Basophile Granulozyten	35	0,5
Lymphozyten	2 275	32,5
Monozyten	280	4
Leukozyten insgesamt	7 000	100,0

Da CM-Viren vorwiegend in CD14-positiven Monozyten zu finden sind, erscheint es sinnvoll, nur diese Zellen für die DNA-Isolierung zu verwenden. Um eine solche Konzentrierung zu erreichen, werden CD14-Beads (Dyna) eingesetzt, die als Antikörper die Oberflächenmarker jener Monozyten erkennen und an sie binden.

Diese Anti-CD14-Mikropartikel sind vor der Entnahme aus dem Originalgefäß kurz zu schütteln. Die gewünschte Menge an Beads wird in ein 1,5 ml-Eppi überführt und in einen Magnetständer (Dyna) gehängt, so dass man den Überstand entfernen kann. Die Beads sind dann im gleichen Volumen eiskalten PBS / 2 % FCS (fötales Kälberserum) zu resuspendieren. Nachdem dieser Vorgang zweimal wiederholt worden ist, werden 25 µl Beads plus 325 µl Heparin-Blut plus 325 µl PBS / FCS in ein frisches Eppi gefüllt, das 60 min bei 4 °C rotieren muß.

Im Magnetseparator ist der Überstand nach erfolgter Sedimentation abzuziehen, bevor die Beads fünfmal mit 500 µl eiskaltem PBS / FCS gewaschen werden, um unspezifisch gebundene Zellen zu entfernen.

2.3.2.1 Silica-Beads

Die DNA-Isolierung aus den gewonnenen Monozyten erfolgt mit Hilfe von Silica-Partikeln. Die noch an CD14-Beads anhaftenden Zellen werden mit 5 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) und 200 µl Lysis-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 500 mM LiCl; 10 mM EDTA, pH 8; 5 mM DTT; 1 % SDS) versehen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut resuspendiert.

Nach einer Inkubation von 30 min bei 55 °C wird im Magnetständer der Überstand, der die DNA enthält, in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert. Um die DNA von den übrigen Zellbestandteilen zu reinigen, werden nun 600 µl Binde-Puffer (7 M NaClO₄; 1 % Sorbit; 100 mM Tris-HCl, pH 8; auf pH 5,7 einstellen) und 5 µl paramagnetische Silica-Beads (Merck) hinzugefügt und mit der Pipette mehrmalig resuspendiert. Es folgt eine Rotation von 20 min bei Raumtemperatur, danach werden im Magnetseparator die Beads immobilisiert und der Überstand abgezogen.

Die Partikel sind in 250 µl Waschpuffer (70 % Ethanol; 50 mM Tris, pH 7; 1 mM EDTA) zu resuspendieren und in den Magnetständer zu bringen, wo der Überstand vollständig (!) zu entfernen ist.

Nun sollen die Beads 10 min lufttrocknen (Es dürfen keine Flüssigkeitsreste vorhanden sein.), bevor man sie in 60 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8 aufnimmt und 10 min bei 50 °C inkubiert (nach 5 min kurz schütteln). Mit Hilfe des Magnetständers wird der Überstand mit der DNA abschließend in ein neues Gefäß überführt.

2.4 Photometer

Nach erfolgter DNA-Isolierung findet mit dem Photometer eine Messung statt, mit welcher die Konzentrationen an gewonnener DNA bestimmt wird. Dazu verdünnen wir jeweils 10 µl der Lösung mit 50 µl H₂O.

Um die sehr unterschiedlichen Konzentrationen der Proben später sinnvoll einsetzen und vergleichen zu können, werden sie - soweit möglich - mit Tris-Puffer (10 mM, pH 8) auf den einheitlichen Wert von 40 ng DNA/µl verdünnt.

Die für diesen Zweck zuzufügende Menge an Tris-Puffer wird folgendermaßen ermittelt:

$$\text{Volumen von Tris} = \text{Konz.} \times 190/40 - 190$$

(200 µl erhaltene Lösung – 10µl Lösung für das Photometer = 190 µl noch vorhandene Lösung)

2.5 PCR und Gelelektrophorese

Die CMV-PCR erwies sich sensitiver als andere Ansätze, erfordert nur wenig Zeit und eine geringe Blutmenge, so dass sie bei der Untersuchung klinischer Proben sehr nützlich ist (Shibata et al. 1988, S. 1185).

Für die Durchführung der PCR standen zwei Geräte zur Verfügung (Autogene II von Grant Instruments und Mastercycler von Eppendorf). Nachdem in Vorversuchen zahlreiche Variationen der PCR getestet worden waren, setzen sich die 25 µl-Ansätze in den 0,5 ml-Eppendorfgefäßen folgendermaßen zusammen:

- 500 ng DNA
- 2,5 µl 10 x Taq-Puffer (Qiagen)
- 5µl Q-Puffer (Qiagen)
- 3 µl MgCl₂
- 1 µl dNTPs (je 10 mM, Eppendorf)
- 10 pmol jedes Primers
- 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (5 u/µl, Qiagen)
- mit sterilem Wasser zum gewünschten Volumen ergänzt

Nach Ablauf der PCR nach dem oben beschriebenen Prinzip folgt zur Analyse der Produkte die Gelelektrophorese, in der die erhaltenen DNA-Fragmente in Abhängigkeit von Molekülgröße und -ladung im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Nachdem das Agarosegel (2 % in 1 x TBE-Puffer: 89 mM Tris/Cl, pH 8,0, 89 mM Borsäure, 20 mM EDTA) in eine Apparatur gegossen wurde und erhärtet ist, wird diese mit Elektrophorese-Puffer (1 x TBE) gefüllt. 8 µl der PCR-Produkte werden mit Gelpuffer (Xylencyanolblau) versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Neben den Proben ist ein Basenpaarstandard anzubringen, um die Länge der DNA-Moleküle abschätzen zu können. Die Gelelektrophorese läuft jeweils eine Stunde bei einer Spannung von 90 mV.

Im Anschluß wird das Gel 10 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (4 µg/ml) angefärbt. Da Ethidiumbromid cancerogen ist, muß mit Handschuhen gearbeitet werden. Danach wird das Gel mit Wasser abgespült, unter UV-Licht betrachtet und zur weiteren Auswertung fotografiert.

2.6 Aufreinigung, Färbung und Anheftung der PCR-Produkte an Beads

Da freie Oligonukleotide die Fluoreszenzintensität während der Messung im Durchflußzytometer vermindern können, werden zuvor nicht eingebaute Primer in den PCR-Proben mit Hilfe einer einfachen und schnellen Methode entfernt, indem nach einem neuen Protokoll zur Aufreinigung von PCR-Produkten vorgegangen wird:

10 µl des PCR-Ansatzes werden mit 2 µl Silica-Beads und 30 µl 8 M NaClO₄ gemischt und 10 min bei 50 °C inkubiert. Das Eppendorfgefäß wird dann in einen Magnetständer gehängt. Nach 30 sec kann der Überstand abgezogen werden. Die Beads werden in 10 µl H₂O resuspendiert und wieder 5 min bei 50 °C inkubiert. Der Überstand wird im Magnetständer nach 30 sec isoliert und in ein frisches Eppendorfgefäß übertragen.

Eine Besonderheit der auf der Durchflußzytometrie basierender Verfahren ist die Notwendigkeit, die PCR-Produkte mit zwei verschiedenen Markierungen zu versehen: die erste zum Anfärben mit einem fluoreszierenden Farbstoff und die zweite zum Binden der PCR-Produkte an Mikropartikel. Dieser Schritt ist erforderlich, da Durchflußzytometer nur fluoreszierende Farbstoffe erkennen, die sich nicht in Lösung befinden, sondern an Strukturen gebunden sind wie z. B. Fluoreszenz-markierte Antikörper an der Zelloberfläche (Wedemeyer/Pötter 2001, S. 2).

Nachdem bereits in der PCR zwei mit Digoxigenin und Biotin markierte Primer verwendet wurden, können diese nun gleichzeitig an Anti-Digoxigenin-Beads gebunden und mit Streptavidin-R-Phycoerythrin gefärbt werden. Die Bindung der PCR-Produkte an Anti-Digoxigenin-Beads und deren Färbung umfaßt folgende Schritte:

30 µl Beads werden mit 500 µl 3 x Bindepuffer (15 mM Tris, pH 7.5; 1,5 mM EDTA; 150 mM NaCl) versetzt. Dann stellt man das Eppendorfgefäß 30 sec in einen Magnetständer, so dass der Überstand abgezogen werden kann. Die Beads sind anschließend in 30 µl 3 x Bindepuffer zu resuspendieren.

Man mischt 2 µl PCR-Produkt mit 2 µl Beads und 2 µl Streptavidin-R-Phycoerythrin (90 µg/µl) und läßt sie 10 min in Dunkelheit rotieren. Die Lösungen werden mit 500 µl Waschpuffer (PBS; 0,04 % Tween) versetzt und 30 sec in einen Magnetständer gestellt. Nach Abziehen des Überstandes sind die Beads in 1,5 ml TE aufzunehmen. Die Proben stehen nun für eine durchflußzytometrische Analyse zur Verfügung.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der durchflußzytometrischen Analyse von CMV-PCR-Produkten

3.1.1 Etablierung einer CMV-spezifischen PCR

Zunächst wurde mit einer Blutprobe eines CMV-Erkrankten eine CMV-spezifische PCR entwickelt. Wir haben verschiedene PCR-Ansätze auf unterschiedliche Gene getestet und uns letztendlich für ein hochkonserviertes Gen des Virus entschieden, das während der Experimente die deutlichsten Resultate zeigte:

Glycoprotein H – Gen (gH)

Zur Untersuchung dieses Gens haben sich besonders folgende hocheffiziente PCRs bewährt:

2 gH-PCRs (davon eine one-step-nested)

UL 93-PCR als Referenz

Dabei wurden Primersequenzen verwendet, die nach einer Recherche in der BLAST-Datenbank keine oder nur einzelne (seltene), nicht die PCR störende Sequenzvariationen aufweisen. 8 µl der Amplifikate wurden auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen und nach der Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid angefärbt.

Durch vielfältige Änderung der Experimente wurde versucht, die PCR zu optimieren, z. B. durch Verwendung von Hot Start, Anti-sense-Primern oder verschiedener Reinigungsverfahren.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die Abhängigkeit der PCR-Produkte von dem Gehalt eingesetzter DNA und der gewählten Anzahl der Vorzyklen (s. 3.1.2). Zur weiteren Steigerung der PCR-Effizienz wurde die Konzentration an MgCl₂ gegenüber Standard-PCRs auf 1 mM heraufgesetzt und die Primerkonzentration auf 1 pmol / µl erhöht.

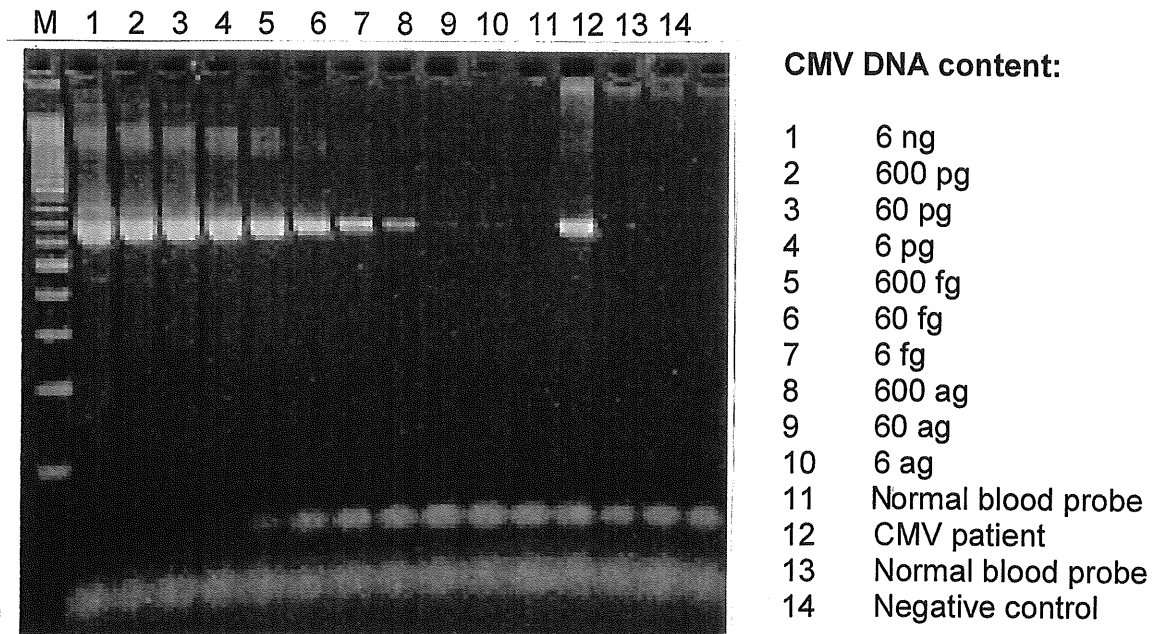


Abb. 3: PCR unterschiedlicher Mengen an CMV-DNA (M: Bp-Leiter)

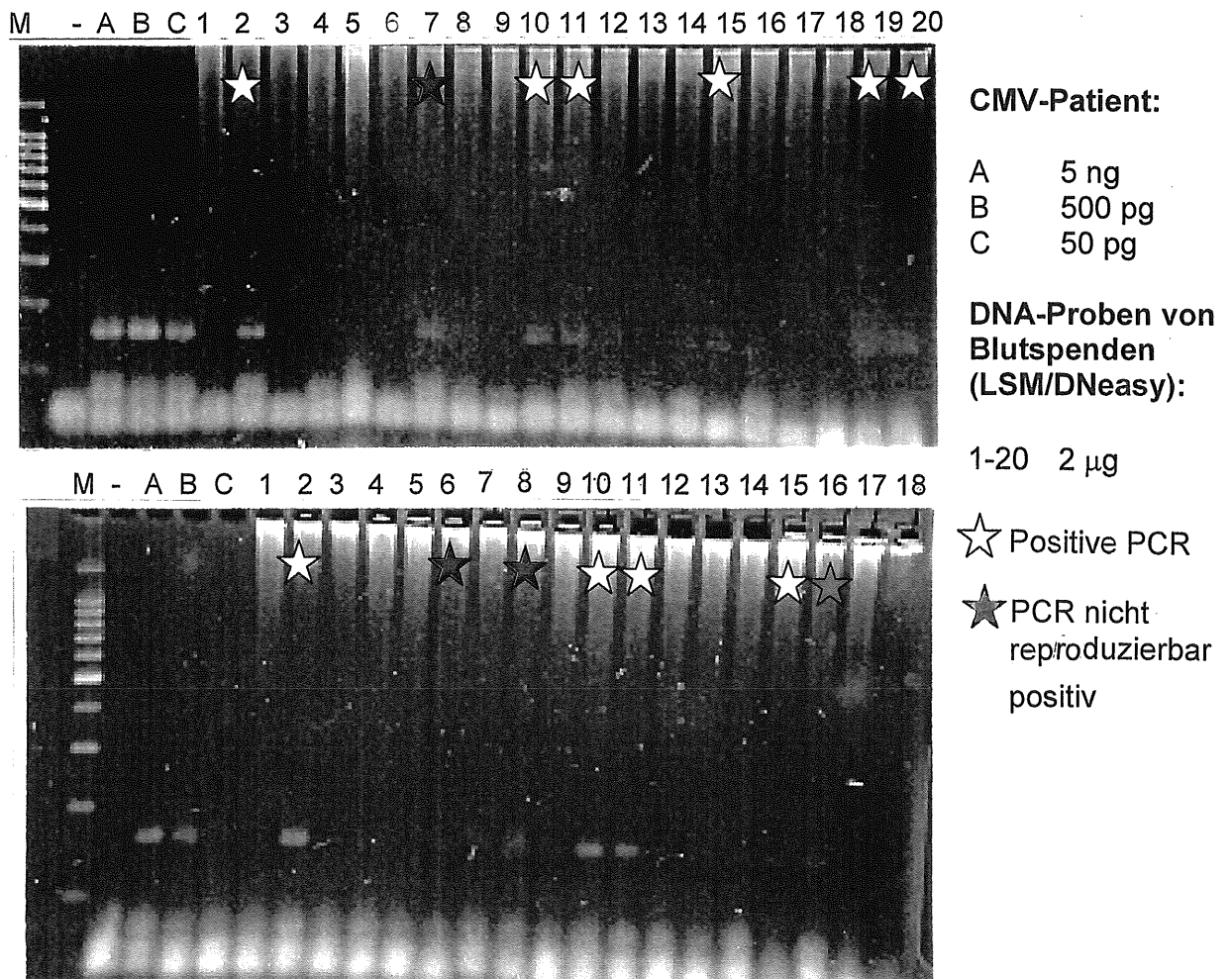


Abb. 4: Vergleich unterschiedlicher PCR-Bedingungen (oben 10, unten 15 Vorzyklen)

Trotz hoher Empfindlichkeit beim Nachweis von CMV-Erkrankungen (Es konnten, wie in der Abbildung 5 gezeigt, noch 8 CMV-Sequenzen - ohne Hintergrund an humaner DNA - detektiert werden.), reichte die Empfindlichkeit nicht aus, latente Infektionen bei immunologisch positiv getesteten Blutproben zuverlässig nachzuweisen. Bei der Austestung von PCR, Gelelektrophorese und Durchflußzytometrie an Patienten-DNA traten Schwierigkeiten auf, deren Bearbeitung im folgenden detailliert geschildert wird:

- Nachweisgrenze: sehr schwache PCR-Produkte infolge zu geringen Gehalts an CMV-DNA bei latenten Infektionen (zu wenige Virenkopien, s. 3.1.2)
- Bildung von Primerdimeren (s. 3.1.3)

3.1.2 Verbesserung der Nachweiseffizienz durch den Einsatz einer nested-PCR

Da die Anzahl von Virengenomenen in einer latent infizierten Zelle zwischen 2 und 13 variiert, müssen für einen erfolgreichen PCR-Nachweis 2 µg DNA eingesetzt werden (Roback et al. 2001). Diese Menge entspricht etwa 250 000 Leukozyten und 8 bis 1560 Genomäquivalenten. Eine höhere DNA-Menge würde die PCR inhibieren, aber auch bei 2 µg DNA ist bereits mit einer Verminderung der Amplifikationseffizienz zu rechnen. Um die geringe PCR-Effizienz für den Nachweis latenter Infektionen auszugleichen, wurde eine sogenannte nested-PCR etabliert, die sich bezüglich CMV als sensitiver erwies (Krajden et al. 1996, S. 31).

Bei der nested-PCR wird erst eine Voramplifikation durchgeführt und dieses Amplifikat nach entsprechender Verdünnung mit innerhalb der voramplifizierten Sequenz (nested) lokalisierten Primern reamplifiziert. In einer 2001 vorgestellten Multicenter-Studie, die verschiedene bereits publizierte CMV-PCR-Nachweise miteinander verglich (Roback et al. 2001), wurde auf die Notwendigkeit einer derartigen nested-PCR hingewiesen. Bis auf ein kommerzielles Nachweissystem der Firma Roche (Amplicor) wurden dabei alle nicht auf nested-PCR beruhenden Verfahren als nicht zuverlässig genug eingeschätzt. Die Austestung mehrerer Primerkombinationen für eine nested-PCR führte zu einer gesteigerten Bildung von Primerdimeren. Begünstigt insbesondere durch den Einsatz großer Primermengen waren bereits nach Gelelektrophorese Primerdimere erkennbar, die für unsere Methode als besonders schädlich anzusehen sind (Abb. 5).

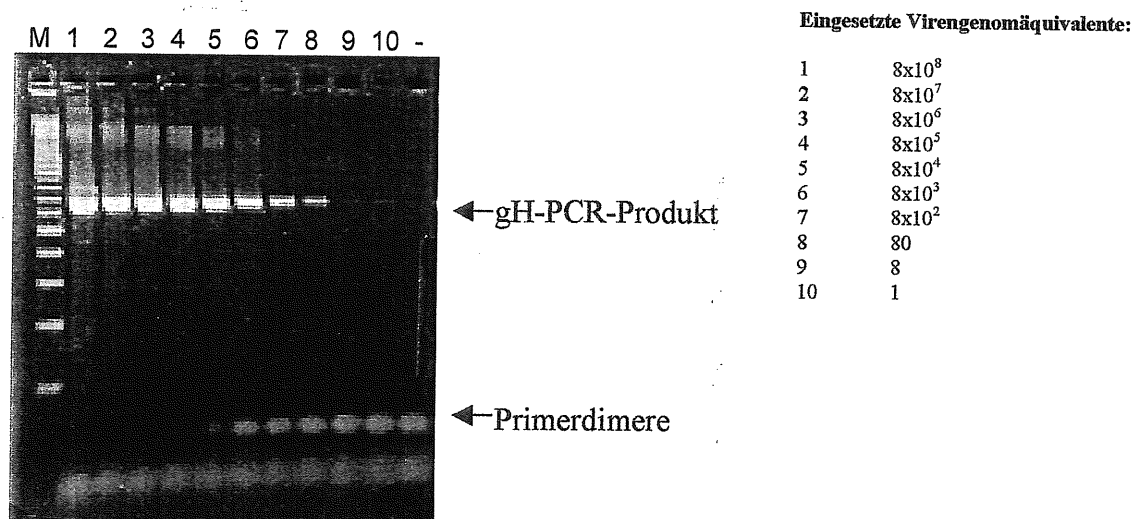


Abb. 5: Vermehrte Bildung von Primerdimeren während der PCR (rechte Spur: keine DNA)

3.1.3 Verhinderung der Entstehung von Primerdimeren

Die artifiziellen Amplifikationsprodukte entstehen zumeist vor der ersten Hitze-denaturierung durch Fehlpaarung von Primern bei niedrigen Temperaturen und anschließender Polymerisation zu kurzen 20 bis 60 Bp-langen doppelsträngigen Fragmenten. Bei Verwendung von markierten Primern für das Abfangen der Produkte mit Mikropartikeln und durch die Fluoreszenzfärbung besteht die Gefahr, dass die Primer selbst fälschlicherweise als spezifische Amplifikate erkannt werden. Dieses Phänomen wird durch den Einsatz sehr hoher Mengen an Primern zur Verbesserung der PCR-Effizienz (nested-PCR) noch verstärkt, so dass die Produkte dieser hocheffizienten PCR störende Faktoren in der durchflußzytometrischen Analyse zeigten. Selbst bei gelelektrophoretisch eindeutig negativer PCR wurden im Durchflußzytometer Produkte nachgewiesen.

Erst die Verwendung sehr geringer Primermengen (Endkonzentration 80 fmol/ μ l) in Kombination mit einem Antikörper gegen das aktive Zentrum der Taq-DNA-Polymerase reduzierte die Menge der gebildeten Primerdimere gegen Null. Mit diesen Modifikationen konnte die Nachweisempfindlichkeit gegenüber den besten getesteten Einzel-PCR-Ansätzen um das ca. 4fache gesteigert werden (von 40 pg DNA aus Leukozyten eines CMV-Patienten auf 11 pg).

3.1.4 Etablierung der durchflußzytometrischen Messung

Im Gegensatz zu den bisher bestehenden durchflußzytometrischen Verfahren zum Nachweis von PCR-Produkten sollte auf jegliche Hybridisierungsreaktionen verzichtet werden, um Zeit und Arbeitsschritte zu reduzieren (s. 1.7).

Deshalb mußten beide Markierungen zur Bindung an die Mikropartikel und zur Fluoreszenzfärbung während der PCR eingebaut werden.

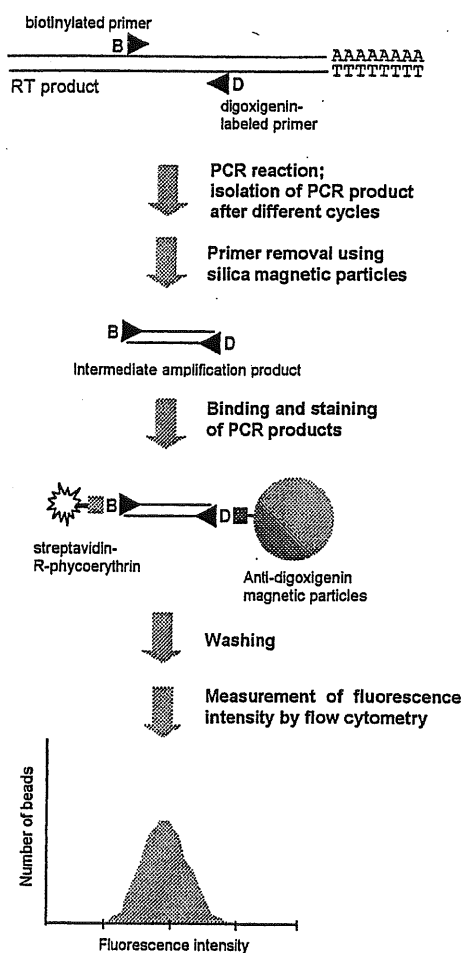


Abb. 6: Schematische Darstellung der durchflußzytometrischen Methode zur Messung von PCR-Produkten (Wedemeyer et al. 2000)

In dem Experiment wurden die Amplifikate durch Primer markiert, die mit Digoxigenin und Biotin konjugiert waren. Die PCR-Produkte wurden mit Mikropartikeln inkubiert, die mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern gekoppelt und gleichzeitig mit Streptavidin-Phycoerythrin Fluoreszenz-markiert sind. Die Fluoreszenzintensität jedes Mikropartikels und damit auch der Gehalt an gebundenem PCR-Produkt wurden im Durchflußzytometer gemessen.

Zur Auswertung wird in der Regel nur ein Bereich der Messergebnisse verarbeitet. Diese Auswahl bezeichnet man als Gating, da dazu ein Fenster um bestimmte Bereiche der Punktwolke gezogen wird, deren Fluoreszenz-Eigenschaften näher zu untersuchen sind (Abb. 7).

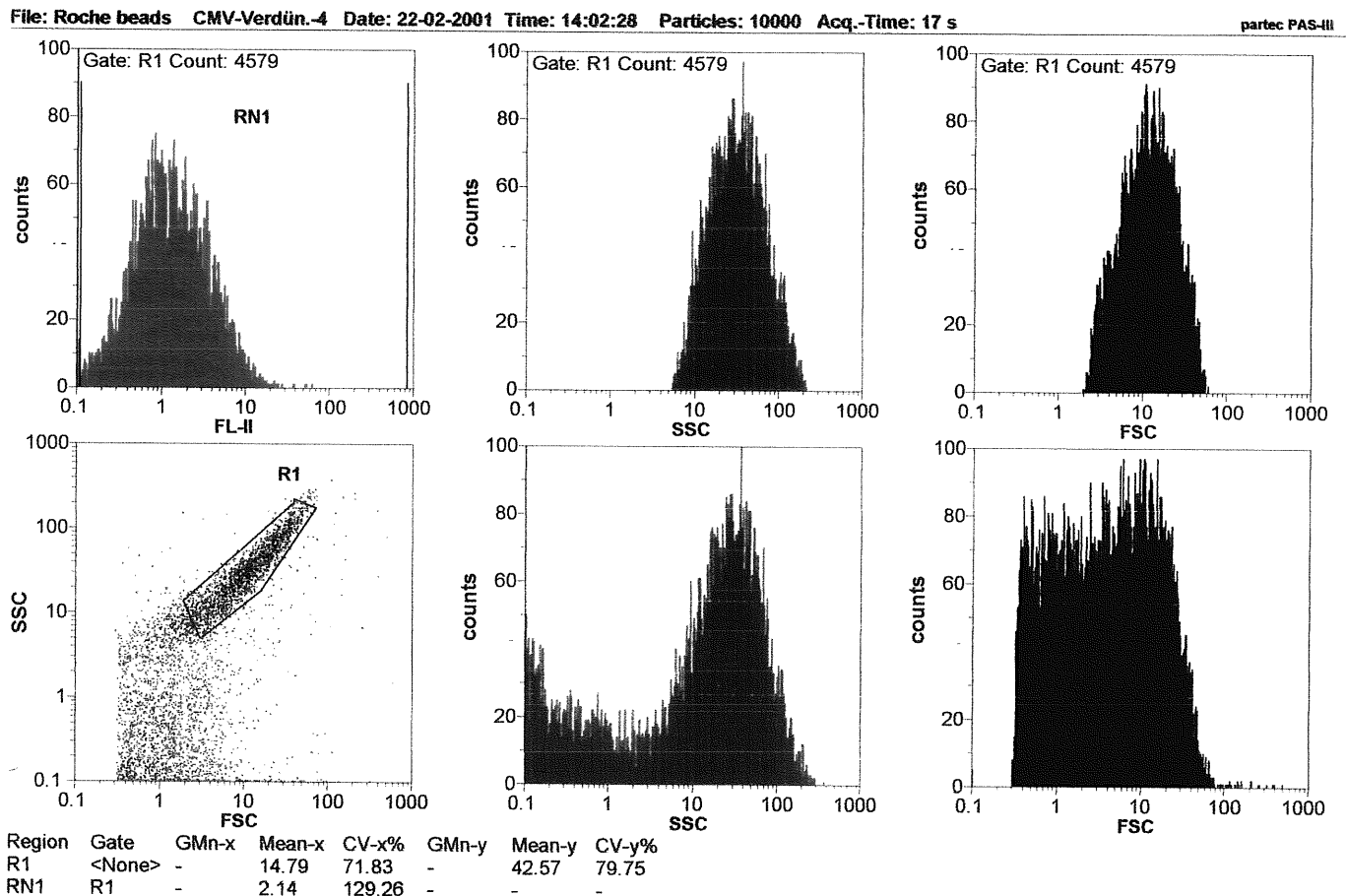


Abb. 7: Histogramm einer durchflußzytometrischen Analyse:
Links sind auf der Abszisse oben die Orange fluoreszenz und unten die Größe der Partikel,
auf der Ordinate die Anzahl bzw. ihre Struktur abzulesen (weitere Abkürzungen s. 1.7).

3.2 Analyse von latenten CMV-Infektionen in Blutproben

Die Sensitivität des beschriebenen Verfahrens war so hoch, dass auch latente Infektionen mit dem Zytomegalie-Virus (CMV) aufgedeckt werden können. Um seine Zuverlässigkeit zu überprüfen, wurden 110 Blutproben jeweils mit verschiedenen Methoden untersucht und die Ergebnisse verglichen.

Dabei wurde der entwickelte Nachweis einem etablierten PCR-Test (UL93) gegenübergestellt, der in der Multicenter-Studie die besten Resultate ergeben hatte (Roback et al. 2001) und eine mit dem neuen Verfahren identische Empfindlichkeit aufwies. Für beide Tests wurden 500 ng DNA als Template eingesetzt.

3.2.1 Beschreibung des Probenmaterials

In Kooperation mit dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums erhielten wir für unsere Experimente innerhalb von einem halben Jahr 180 Blutproben, die mit Heparin versetzt und zum Teil bereits immunologisch untersucht waren.

Von den 80 vorgetesteten Patientenproben, die uns für den Versuch zur Verfügung standen, waren 15 serologisch positiv, 4 hingegen nicht eindeutig diagnostizierbar.

3.2.2 Beschreibung der Aufarbeitungsmethode

Die Isolierung der DNA aus den Blutprodukten machte einen großen Anteil an der praktischen Arbeit aus. In Vorversuchen wurden die im Kap. 2.3 erörterten drei verschiedenen Möglichkeiten zur DNA-Aufbereitung getestet. Dabei ist eine Isolierung direkt aus Vollblut für unsere Zwecke rasch ausgeschieden, da man eine zu große Blutmenge braucht, um die zum Nachweis erforderliche Virenkopienzahl zu erhalten.

Da sich das LSM-Verfahren, mit dem sämtliche Leukozyten isoliert werden, in den Vorversuchen als besonders geeignet erwies, wählten wir zunächst diese Methode, um die DNA aus den vorliegenden Blutproben zu gewinnen (s. 2.3.1).

Tabelle: Ergebnisse der DNA-Isolierung

Probennummer	DNA-Konzentration (ng / μ l)	Menge an Tris-Puffer (μ l)	Gesamtvolumen der Lösung mit 40 ng / μ l (μ l)
2	21,9		
3	67,6	131,100	198,700
4	79,4	187,150	266,550
5	60,3	96,425	156,725
6	63,8	113,050	176,850
7	74,6	164,350	238,950
8	122,2	390,450	512,650
9	89,5	235,125	324,625
10	83,1	204,725	287,825
11	144,6	496,850	641,450
12	111,5	339,625	451,125
13	42,7	12,825	55,525
14	41,9	9,025	50,925
15	79,5	187,625	267,125
16	72,1	152,475	224,575
17	71,9	151,525	223,425
18	65,7	122,075	187,775
19	81,1	195,225	276,325
20	131,8	436,050	567,850
21	90,6	240,350	330,950
22	133,5	444,125	577,625
23	116,0	361,000	477,000
24	63,2	110,200	173,400
25	75,7	169,575	245,275
26	110,7	335,825	446,525
27	76,9	175,275	252,175
28	69,8	141,550	211,350
29	81,4	196,650	278,050
30	150,6	525,350	675,950
31	100,0	285,000	385,000
32	127,5	415,625	543,125
33	108,5	325,375	433,875
34	88,8	219,600	308,400
35	72,3	153,425	225,725
36	88,2	228,950	317,150
37	86,3	219,925	306,225
38	97,9	275,025	372,925
39	88,1	228,475	316,575
40	90,3	238,925	329,225
41	62,7	107,825	170,525
42	121,1	385,225	506,325
43	38,6		
44	52,9	61,275	114,175

45	54,4	68,400	122,800
46	104,2	304,950	409,150
47	67,2	129,200	196,400
48	63,2	110,200	173,400
49	65,6	121,600	187,200
50	95,3	262,675	357,975
51	80,8	193,800	274,600
52	63,7	112,575	176,275
53	92,2	247,950	340,150
54	73,8	160,550	234,350
55	106,4	315,400	421,800
56	79,6	188,100	267,700
57	107,9	322,525	430,425
58	87,3	224,675	311,975
59	75,4	168,150	243,550
60	94,3	257,925	352,225
61	148,6	515,850	664,450
62	88,6	230,850	319,450
63	132,2	437,950	570,150
64	105,2	309,700	414,900
65	60,4	96,900	157,300
66	88,2	228,950	317,150
67	102,9	298,775	401,675
68	104,0	304,000	408,000
69	77,2	176,700	253,900
70	109,8	331,550	441,350
71	132,8	440,800	573,600
72	109,6	330,600	440,200
73	110,9	336,775	447,675
74	126,0	408,500	534,500
75	262,0	1054,500	1316,500
76	190,6	715,350	905,950
77	149,5	520,125	669,625
78	112,3	343,425	455,725
79	63,7	112,575	176,275
80	101,0	289,750	390,750
81	116,2	361,950	478,150
82	116,0	361,000	477,000
83	101,7	293,075	394,775
84	106,4	315,400	421,800
85	68,3	134,425	202,725
86	83,3	205,675	288,975
87	99,3	266,850	366,150
88	106,5	315,875	422,375
89	152,6	534,850	687,450
90	34,3		
91	114,8	355,300	470,100

92	70,0	142,500	212,500
93	81,8	198,550	280,350
94	98,3	262,350	360,650
95	103,5	301,625	405,125
96	99,0	280,250	379,250
97	103,9	303,525	407,425
98	130,0	427,500	557,500
99	251,2	1003,200	1254,400
100	122,4	391,400	513,800
101	86,2	219,450	305,650
102	83,1	204,725	287,825
103	57,7	84,075	141,775
104	79,4	187,150	266,550
105	85,8	217,550	303,350
106	101,6	292,600	394,200
107	83,4	206,150	289,550
108	69,0	137,750	206,750
109	83,0	204,250	287,250
110	80,7	193,325	274,025
111	54,6	69,350	123,950
112	82,8	203,300	286,100
113	229,8	901,550	1131,350
114	87,0	223,250	310,250
115	143,9	493,525	637,425
116	54,5	68,875	123,375
117	123,9	398,525	522,425
118	169,5	615,125	784,625
119	123,6	397,100	520,700
120	132,1	437,475	569,575
121	49,4	44,650	94,050
122	116,4	362,900	479,300
123	90,8	241,300	332,100
124	96,7	269,325	366,025
125	79,9	189,525	269,425
126	129,7	426,075	555,775
127	72,6	154,850	227,450
128	95,0	261,250	356,250
129	83,1	204,725	287,825

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts nach der Isolierung wurden 128 Proben im Photometer gemessen. Die ermittelten Konzentrationen sind in der zweiten Spalte der Tabelle aufgeführt. In der dritten Spalte ist die Menge an zugefügtem Tris-Puffer (10 mM, pH 8) abzulesen, mit der die Proben auf den einheitlichen Wert von 40 ng DNA / μ l verdünnt wurden.

Die bei der LSM-Methode verarbeiteten 2 ml Blut enthalten etwa 1,75 Millionen Zellen und ergeben schließlich 200 μ l Flüssigkeit, die die isolierte DNA enthält. Da die Messung im Photometer eine durchschnittliche Konzentration von 90 ng DNA / μ l ergab, betrug die Gesamtmenge der gewonnenen DNA:

$$90 \text{ ng DNA / } \mu\text{l} \times 200 \mu\text{l} = 18 \mu\text{g DNA.}$$

Nach einer Verdünnung auf die einheitliche Konzentration von 40 ng DNA / μ l wurden bei der PCR z. B. 5 μ l eingesetzt:

$$5 \mu\text{l} \times 40 \text{ ng DNA / } \mu\text{l} = 200 \text{ ng DNA.}$$

Diese Menge entspricht dem 90. Teil der gesamten DNA. Um Rückschlüsse auf die Zellzahl ziehen zu können, die dieser DNA-Menge entspricht, muß man durch 90 dividieren:

$$1,75 \text{ Mill. Zellen} : 90 = 19\,444 \text{ Zellen.}$$

Bei der PCR wurde folglich mit der DNA von etwa 20 000 Zellen gearbeitet.

3.2.3 Ergebnisse der UL93-PCR

Mit dem als Referenz gewählten UL93-Test wurden 18 Proben als positiv getestet, von denen aber nur 6 mit den immunologischen Daten übereinstimmten. Die Wiederholung der PCR der positiv getesteten Proben war jedoch bei 4 negativ.

3.2.4 Ergebnisse des durchflußzytometrischen Verfahrens

Mit der durchflußzytometrischen Analyse wurden 4 Proben positiv gewertet, von denen 3 mit den immunologischen Ergebnissen übereinstimmten. Alle positiven Tests inklusive der immunologisch negativ getesteten Proben konnten in einer Wiederholung der PCR eindeutig bestätigt werden.

Proben mit einer Fluoreszenzintensität unter 10 % der maximal gemessenen Fluoreszenz (120 willkürliche Einheiten) wurden als negativ definiert (unterhalb der gepunkteten Linie in Abb. 9). Außerdem wurden 3 Proben mit Werten zwischen 14 und 22 als unsicher eingestuft, obwohl die gelelektrophoretische Analyse keine Produkte zeigte. Hierbei handelte es sich trotz der beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen vermutlich um Primerdimere (s. 3.1.3 und Abb. 8).

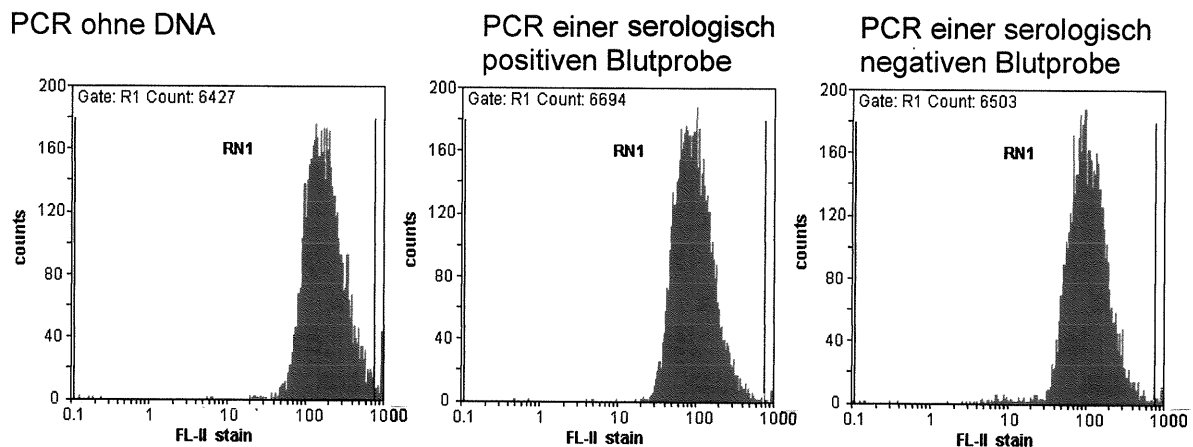


Abb. 8: Durchflußzytometrische Analyse serologisch positiver und negativer Blutproben

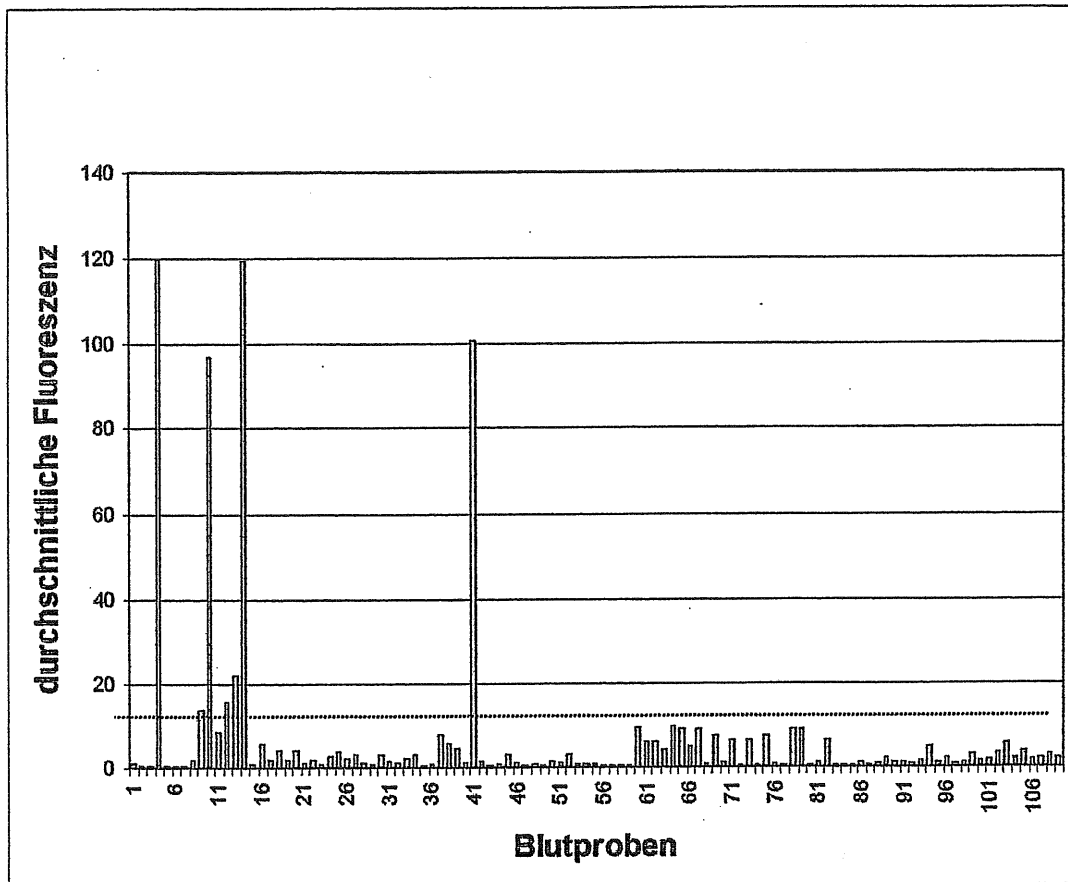


Abb. 9: Untersuchung von 110 Blutspendern auf latente CMV-Infektion mit der nested gH-PCR und anschließender Durchflußzytometrie. Von je 5 ml Blut (EDTA) wurden die Leukozyten isoliert und genomische DNA präpariert. Zur nested-PCR (25 µl Gesamtansatz) mit CMV-gH-spezifischen Primern wurden 500 ng genomische DNA eingesetzt. Proben mit einer mittleren Fluoreszenz (relative Einheiten) unter 12 (10 % der maximalen gemessenen Werte) wurden als CMV-negativ gewertet.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die folgenden Tabellen verdeutlichen die Ergebnisse der verschiedenen Methoden.

Tabelle: Ergebnisse unterschiedlicher Nachweisverfahren

(0 = CMV-negativ, 1 = CMV-positiv, 2 = nicht eindeutig)

Proben- nummer	CMV-Status (immunolog.)	UL93-PCR	eigener Assay- Gel	eigener Assay- FlowCyt
2	0	0	0	1,05
11	1	1	0	0,52
19	0	0	0	0,37
20	1	0	1	119,69
21	0	1	0	0,34
22	2	0	0	0,37
23	1	1	0	0,36
25	0	0	0	1,77
27	0	0	0	11,66
28	1	0	1	96,93
29	0	0	0	8,67
30	0	1	0	11,58
31	0	0	0	21,75
32	0	0	1	119,25
33	0	0	0	0,61
34	0	0	0	5,39
35	1	0	0	1,88
36	1	0	0	4,17
37	2	1	0	1,92
38	0	0	0	3,93
40	0	0	0	0,93
41	0	0	0	2
42	2	0	0	0,73
43	0	0	0	2,47
44	0	0	0	3,85
45	0	0	0	2,05
46	0	0	0	3,01
47	0	0	0	1,02
48	0	0	0	0,8
49	0	0	0	2,87
50	1	0	0	1,56
51	0	0	0	0,99
52	1	0	0	2,08
53	0	0	0	3,08
54	0	0	0	0,45
55	1	0	0	0,58
56	0	0	0	7,86
58	0	0	0	5,36
59	0	0	0	4,45
60	0	1	0	0,97
61	1	1	1	100,48
62	1	2	0	1,33
63	0	1	0	0,35
64	1	1	0	0,58
65	0	1	0	2,86
66	0	0	0	1,23
67	1	0	0	0,29
68	0	1	0	0,77
69	0	1	0	0,4
70	0	2	0	1,57
71	0	2	0	1,11
72	1	1	0	3,11
73	0	2	0	0,61
74	0	1	0	0,56

75	0	0	0	0,68
76	0	0	0	0,31
77	0	0	0	0,38
78	0	0	0	0,46
79	1	0	0	0,4
80	2	0	0	9,22
81		0	0	5,89
82		0	0	5,79
83		0	0	4,18
84		0	0	9,62
85		0	0	8,94
86		0	0	4,95
87		0	0	8,82
88		0	0	0,73
89		0	0	7,24
90		0	0	1,25
91		0	0	6,38
92		0	0	0,45
93		0	0	6,31
94		0	0	0,48
95		0	0	7,52
96		0	0	0,83
97	1	0	0	0,42
98	1	0	0	8,98
99	0	0	0	8,95
100	0	0	0	0,52
101	1	0	0	1,23
102	0	0	0	6,13
103	0	0	0	0,43
104	0	0	0	0,38
105	1	0	0	0,31
106	0	0	0	1,21
107	0	0	0	0,55
108	0	0	0	0,8
109	0	0	0	2,2
110	0	0	0	0,98
111	0	0	0	0,98
112	0	0	0	0,79
113	0	0	0	1,36
114	0	0	0	4,71
115	0	0	0	1,04
116	0	0	0	2,31
117	0	0	0	0,74
118	0	0	0	1,26
119	0	0	0	3,05
120	0	0	0	1,41
121	0	0	0	1,81
122	0	0	0	3,27
123	0	0	0	5,4
124	0	0	0	2,25
125	0	0	0	3,85
126	0	0	0	1,72
127	0	0	0	2,12
128	0	0	0	2,86
129	0	0	0	2,29

Aufgrund der zahlreichen Vorversuche stand für einzelne Ansätze nicht mehr ausreichend DNA zur Verfügung, so dass sie aus den fortlaufenden Probennummern herausfielen.

Tabelle: Auswertung der CMV-PCR

Methode	Gesamt	negativ	positiv	Identisch mit positiv 1	Identisch mit positiv 2	Identisch mit positiv 3	Identisch mit positiv 4	vermeintlich falschpositiv**	unsicher
1. Immun.	80	61	15	100%	36%	75%	75%	?	4
2. UL93-PCR	110	88(66*)	18(14*)	33%	100%	25%	25%	9	4(0*)
3. Unsere Gel	110	106(76*)	4(0*)	20%	7%	100%	100%	1	0
4. Unsere FloCyt	110	103(73*)	4(0*)	20%	7%	100%	100%	1	3(0*)

* von den 80 immunologisch getesteten Proben

** immunologisch negativ, jedoch PCR-positiv

Tabelle: Vergleich der immunologisch getesteten Proben mit den Ergebnissen der UL93-PCR

		Immunologisch		Summe
		positiv	negativ	
UL93-PCR	positiv	5	9	14
	negativ	10	37	47
	Summe	15	46	61

Zur Bewertung dienen die Sensitivität und Spezifität, mit denen die Qualität diagnostischer Tests beurteilt wird.

Die Sensitivität ist die Wahrscheinlichkeit, mit der eine immunologisch positive Probe ein positives Testergebnis in der UL93-PCR aufweist:

$$\text{Sensitivität} = 5/15 = 33,33 \%$$

Die Spezifität ist die Wahrscheinlichkeit, mit der die UL93-PCR bei einem immunologisch negativen Patienten ebenfalls negativ ausfällt:

$$\text{Spezifität} = 37/46 = 80,43 \%$$

Tabelle: Vergleich der immunologisch getesteten Proben mit den Ergebnissen der eigenen PCR und anschließenden durchflußzytometrischen Messung

		Immunologisch		Summe
		positiv	negativ	
PCR und Durchflußzytometrie	positiv	3	1	4
	negativ	12	45	57
Summe		15	46	61

$$\text{Sensitivität} = 3/15 = 20,0 \%$$

$$\text{Spezifität} = 45/46 = 97,83 \%$$

Das abschließende Urteil lautet, dass die durchflußzytometrische Analyse von CMV-PCR-Produkten zwar nicht empfindlich genug ist, um alle immunologisch nachgewiesenen Infektionen zu detektieren, sie ist jedoch hochspezifisch und reproduzierbar. Wir haben gezeigt, dass die Kombination von Mikropartikeltechnik und Durchflußzytometrie zuverlässige und vollständig automatisierbare Analysen ermöglicht.

Im Gegensatz dazu zeigt der UL93-PCR-Test entgegen der publizierten Daten und trotz ähnlicher Empfindlichkeit eine zu hohe Rate an Falschpositiven.

3.3 Isolierung der CD14-positiven Zellen zur Optimierung der CMV-PCR-Effizienz

Während für den PCR-Nachweis einer latenten Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) oder dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) bereits 1 ml Plasma ausreicht, gilt der PCR-Nachweis einer latenten Infektion mit dem Zytomegalievirus als besonders problematisch, da nur 0,01 bis 0,14 % aller mononukleären Zellen CMV-Genomkopien enthalten. Um die Empfindlichkeit des durchflußzytometrischen Verfahrens zu steigern und wenige Virengenom-Äquivalente im peripheren Blut nachzuweisen, versuchten wir auf unterschiedliche Weise die Methode zu verbessern. Durch ein optimiertes Aufreinigungsverfahren wurde eine Konzentrierung der virentragenden Zellen angestrebt.

Während sich im Verlauf einer latenten Infektion nur ein kleiner Anteil der CM-Viren in CD8-positiven Zellen findet (Soderberg et al., 1993), sind die meisten Viren in CD14-positiven Monozyten lokalisiert. Der Anteil CD14-positiver Zellen an den Leukozyten beträgt etwa 10 – 20 %.

Wenn nach der LSM-Methode 20 000 Leukozyten (s. 3.2.2) und somit nur 2 000 CD14-positive Zellen verarbeitet werden, erscheint es unwahrscheinlich, dass sich darunter virentragende befinden. Denn nur jede 20 000. bis 50 000. Zelle ist mit CM-Viren infiziert, so dass für den zuverlässigen Nachweis wesentlich mehr Zellen einzusetzen sind.

Um die infizierten Zellen aus den Blutproben anzureichern, wurden sie mit Anti-CD14-Antikörper-gekoppelten Mikropartikeln behandelt. Nach dem Abfangen der Monozyten wurde die DNA mit Hilfe von Silica-Partikeln isoliert.

Da für alle Arbeitsschritte inklusive Zellisolierung, DNA-Aufbereitung und PCR-Nachweis ausschließlich paramagnetische Mikropartikel eingesetzt werden, ist eine vollständige Automatisierbarkeit des Verfahrens nach folgendem Schema gewährleistet (Abb. 10).

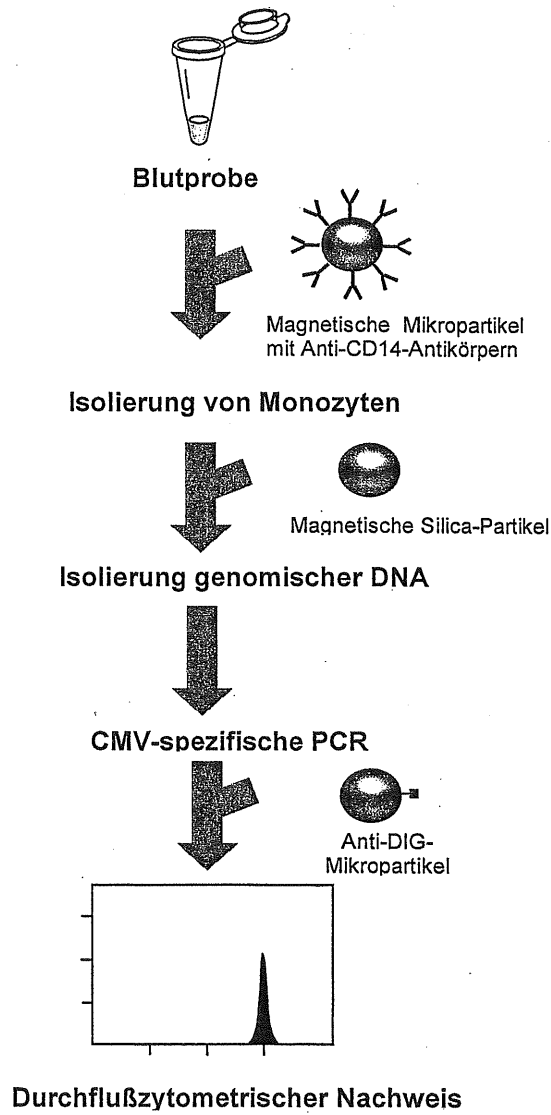


Abb. 10: Darstellung einer auf den Einsatz von Mikropartikeln beruhenden, voll automatisierbaren Methode zum durchflußzytometrischen Nachweis von CMV-Genen in Blutproben

Die Ergebnisse dieser Methode zeigen eine erhebliche Steigerung der Sensitivität gegenüber denen nach DNA-Isolierung aus Leukozyten. Dies wird deutlich beim Vergleich der erforderlichen DNA-Mengen. Von der genomischen DNA aus Leukozyten wurden 2 µg (Spur 1), 1 µg (Spur 2) und 500 ng (Spur 3) zur CMV-gH-PCR eingesetzt. Von der genomischen DNA aus Monozyten, die mit Hilfe von CD14-Mikropartikeln isoliert wurde, wurden 500 ng (Spur 7) und 200 ng (Spur 8) verwendet. Als positive Kontrollen wurden drei verschiedene Verdünnungen der genomischen DNA von einem CMV-Patienten amplifiziert (Spuren 4 - 6). Die Amplifikate wurden gelelektrophoretisch getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

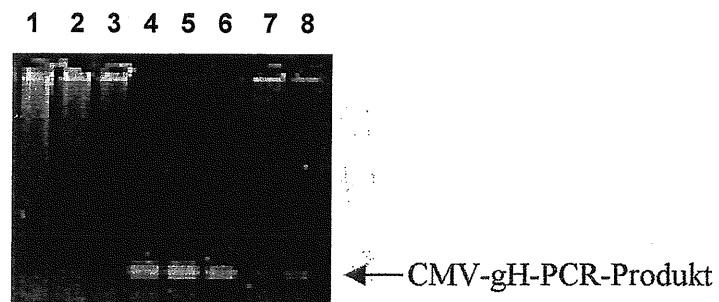


Abb. 11: Vergleichende PCR mit DNA aus Leukozyten und Monozyten eines latent CMV-infizierten Probanden

Obwohl die PCR aus Monozyten-DNA mit geringeren DNA-Mengen als die PCR aus Leukozyten-DNA durchgeführt wurde, lassen sich noch deutliche PCR-Produkte nachweisen. Das bedeutet eine mindestens zehnfache Steigerung der Empfindlichkeit des Verfahrens.

4 Diskussion

Die Entwicklung diagnostischer Verfahren, die CMV-Infektionen schnell und früh erkennen, Zytomegalie von anderen opportunistischen Infektionen differenzieren, den Einsatz antiviraler Medikamente steuern sowie die Interaktion von CMV und dem Immunsystem erforschen, ist von großem praktischen Interesse (Tanabe et al. 1996, S. 1510).

4.1 Schwieriger Nachweis latenter CMV-Infektionen

In der CMV-Diagnostik stößt man auf verschiedene technische Schwierigkeiten, die bei der Laborarbeit immer wieder vor neue Herausforderungen stellen. Das wesentliche Problem aller bestehenden Nachweisverfahren liegt in dem bei latenten Infektionen sehr geringen Anteil virentragender Zellen im peripheren Blut.

Klassische Verfahren wie z. B. die Zellkultur sind zwar als sichere Methoden anzusehen und werden routinemäßig in der klinischen Diagnostik eingesetzt, erweisen sich aber bei der jährlich anfallenden Probenmenge von etwa 4 Millionen Blutspenden in Deutschland als zu zeit- und arbeitsaufwendig. Nukleinsäuretechniken ermöglichen aufgrund ihrer hohen Sensitivität den Nachweis viraler Sequenzen bereits in der Frühphase der Infektion vor der Serokonversion, sind jedoch als unsicher einzustufen. Da auch das ELISA-Verfahren ungenaue Ergebnisse liefert, wird versucht, mit Hilfe der PCR die Zuverlässigkeit des CMV-Nachweises zu verbessern. Für die PCR werden jedoch zu große DNA-Mengen benötigt, wobei sich diese ab einer bestimmten Menge inhibierend auswirken. Ferner kommt es bei der PCR zu falsch positiven Ergebnissen, wenn eine negative Blutprobe mit dieser Methode als positiv eingestuft wird.

Die nested-PCR ist trotz Erhöhung der Sensitivität technisch schwieriger durchzuführen: Sie neigt zu Kontaminationen und zeigt eine geringe Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen den Laboren, was ihre Eignung für die Routinediagnostik verringert. Bei der Untersuchung möglicherweise infektiöser Blutprodukte ist die

Unterscheidung zwischen replizierenden und latent vorhandenen Viren besonders problematisch. Um eine verlässliche Einschätzung einer fraglichen CMV-Infektion und der klinischen Manifestation zu gewährleisten, werden hoch standardisierte PCR-Verfahren gefordert (Krajden et al. 1996, S.31f).

Auch in dieser Arbeit wurde beobachtet, dass mit einer konventionellen PCR-Analyse ein Nachweis nicht zuverlässig möglich ist. Weder die demonstrierte hohe Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens noch die Voramplifikation (nested-PCR) reichte aus, um die Mehrzahl der immunologisch CMV-positiven Blutproben zu identifizieren.

Mit einer Erhöhung der Amplifikationsrate durch optimierte PCR-Bedingungen kann die Empfindlichkeit des CMV-Nachweises gesteigert werden. Damit ist jedoch die Gefahr verbunden, dass Primerdimere und andere artifizielle Amplifikate verstärkt auftreten, die die Zuverlässigkeit des Verfahrens herabsetzen. Bei Maßnahmen zur Steigerung der Empfindlichkeit beim Nachweis latenter Infektionen ist also zwischen möglichen Verbesserungen und störenden Einflüssen abzuwägen.

4.2 Steigerung der Sensitivität

4.2.1 DNA-Isolierung

Die DNA kann aus Leukozyten schnell und routinemäßig isoliert werden. Benötigt werden allerdings relativ große DNA-Mengen, um mit der anschließenden PCR einen CMV-Nachweis durchführen zu können.

Krajden et al. verglichen verschiedene Wege der DNA-Aufbereitung und betonten deren Bedeutung: „Of 101 samples from seropositive blood donors, CMV was detected in 0 (0%) of the samples extracted with a QIAamp blood kit (QIAGEN), 1 (1%) of the samples extracted with an Amplicor whole-blood specimen preparation kit (Roche), and 8 (8%) of the samples extracted with an Isoquick nucleic acid extraction kit (modified by the addition of carrier tRNA) (Microprobe) ... We then demonstrated that sample preparation dramatically altered the detection rate of CMV in samples from blood donors” (Krajden et al. 1996, S. 29f). Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Einzel-PCR für zuverlässige Aussagen über den CMV-Status nicht sensitiv genug ist.

Um trotz der gewählten stringenten PCR-Bedingungen die für die CMV-Diagnostik notwendige Empfindlichkeit zu erreichen, ist eine Anreicherung der virentragenden CD14-positiven Zellen vor der Analyse erforderlich.

Die DNA-Aufbereitung aus Monozyten mit Hilfe von CD14-Beads dauert wesentlich länger als die DNA-Isolierung aus Leukozyten: etwa dreimal solange. Zudem ist das Verfahren teurer. Da das Zytomegalievirus jedoch hauptsächlich in Monozyten und weniger häufig in anderen Leukozyten vorkommt, können nach Monozytenisolierung mit weniger DNA bessere Ergebnisse erzielt werden. Ferner wird die Methode zukünftig automatisierbar sein, so dass der Mehraufwand durch einen zusätzlichen Verfahrensschritt nicht so gravierend erscheint.

Die folgende Tabelle stellt die Vor- und Nachteile der verschiedenen Verfahren zur DNA-Isolierung gegenüber.

Tabelle: Vergleich der DNA-Isolierung aus Leukozyten und Monozyten

DNA-Isolierung	Vorteile	Nachteile
klassisch: Buffy Coat-Prep (LSM) → alle <u>Leukozyten</u>	schnell (ca. 1h) Routine	große Mengen erforderlich, um mit PCR und Durchflußzytometrie CMV nachzuweisen
CD14-Beads → nur <u>Monozyten</u>	mit weniger DNA bessere Ergebnisse (mind. 10fache Steigerung der Sensitivität) automatisierbar (zukünftig)	langwierig (ca. 3h) teuer

Das Fazit lautet: Die DNA-Isolierung mit CD14-Beads ergibt eine bessere PCR.

4.2.2 DNA-Analyse

Infolge der geschilderten Probleme heutiger Nachweismethoden wurde versucht, durch die Kombination von Mikropartikeln und Durchflußzytometrie einen geeigneten Weg für eine bessere CMV-Diagnostik einzuschlagen. Die experimentelle Bandbreite der in den letzten Jahren veröffentlichten molekularen Verfahren, bei denen Mikropartikel mit Durchflußzytometrie kombiniert wurden, zeigt deutlich die vorhandenen technischen Möglichkeiten. Mit Hilfe des Durchflußzytometers lassen sich die durchschnittliche Fluoreszenzintensität, Größe und Form der Partikel charakterisieren, so dass die Durchflußzytometrie bereits in der molekulargenetischen Forschung angewendet und zudem ständig weiterentwickelt wird. Damit sich das Verfahren zur durchflußzytometrischen Analyse auch in der klinischen Routinediagnostik durchsetzen kann, sind folgende Punkte zu beachten:

- der für die zahlreichen Arbeitsschritte erforderliche Zeitaufwand
- das Verhindern von störenden Primerdimeren in der Durchflußzytometrie
- die Automatisierbarkeit aller Arbeitsschritte.

4.2.2.1 Der zeitliche Aspekt

Die mit Durchflußzytometern technisch mögliche Analyseleistung liegt bei etwa 100 000 Partikeln pro Sekunde. Die neuen Kompaktgeräte (CyFlow) könnten auch in konventionelle Automatisierungssysteme integriert werden. Die Meßgeschwindigkeit ließe sich noch deutlich steigern. Da in dem hier beschriebenen Verfahren auf Hybridisierungsschritte und Antikörpermarkierungen verzichtet wurde, konnte dessen Dauer auf 25 min reduziert werden. Die Methode ist damit viermal schneller als das schnellste bis zu diesem Zeitpunkt beschriebene Verfahren zum durchflußzytometrischen Nachweis von PCR-Produkten. Wesentlicher Grund dafür ist der Einsatz des Farbstoffs Streptavidin-Phycoerythrin, der eine Fluoreszenz-Markierung der Amplifikate bereits während der Bindung an die Partikel ermöglicht. Zwar ist die Empfindlichkeit etwas geringer als bei einigen früheren Verfahren, bei denen durch Einbau mehrerer Digoxigeninmoleküle pro Amplifikat die Zahl der Bindestellen für die

Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper erhöht wurde. Sie ist jedoch wie gezeigt deutlich höher als die von konventionellen Verfahren auf Gelbasis. Zudem wird durch die Anfärbung jedes Amplifikats mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff die Proportionalität zwischen Fluoreszenzintensität und Menge an abgefangenen PCR-Produkten bewahrt. Dies alles schlägt sich nicht zuletzt in der hohen Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens nieder. Für eine höhere Robustheit des Verfahrens muß die Stabilität des Farbstoffs nach Markierung der gebundenen Amplifikate jedoch noch verbessert werden. Ein Test von Puffern, die die Fluoreszenzintensität bei Probenlagerung zumindest über mehrere Stunden gleich halten, steht noch aus. Zu Phycoerythrin gibt es mit dem Farbstoff Alexa-488 eine hinsichtlich der Fluoreszenzintensität adäquate Alternative, die jedoch noch nicht geprüft wurde. Der getestete Tandemfarbstoff Phycoerythrin-Cy5 verbesserte die Stabilität der Fluoreszenz nicht (Wedemeyer, persönliche Mitteilung).

4.2.2.2 Durchflußzytometrie

Die zu geringe Empfindlichkeit der Einzel-PCR macht den Einsatz der nested-PCR notwendig. Damit verbunden ist jedoch das vermehrte Auftreten von Primerdimeren, die bei der zytometrischen Messung fälschlicherweise als positiv gewertet werden. Erst eine Verringerung der Primermengen sowie die Zugabe von Taq-Antikörpern lösen dieses Problem weitgehend.

Nicht nur einzelne, sondern auch multiple PCR-Produkte können durchflußzytometrisch nachgewiesen und analysiert werden. Die PCR-Technik ist wie beschrieben trotz ihrer Einfachheit und weiten Verbreitung anfällig für experimentelle Schwankungen, die sich in einer wechselnden Menge an gebildetem Amplifikat niederschlagen. Die schwierige Automatisierbarkeit des Nachweisverfahrens ist ein Grund dafür, dass sich z.B. die kompetitive PCR in der klinischen Diagnostik nicht durchsetzen konnte (Zimmermann/Mannhalter 1996).

Eine weitere Möglichkeit der Steigerung der Empfindlichkeit ist die Signalverstärkung. Dies könnte beispielsweise durch den Einsatz eines grünen oder leistungsstärkeren blauen Lasers geschehen.

4.2.2.3 Automatisierung

Die Forderung nach einer Automatisierbarkeit des Verfahrens führt zum Einsatz paramagnetischer Mikropartikel. Diagnostische Möglichkeiten dieser Partikel wurden erst in letzter Zeit beschrieben (Wedemeyer/Pötter 2001). Die Vorteile der geschilderten Methode liegen neben ihrer hohen Empfindlichkeit in der Automatisierbarkeit, so dass eine große Anzahl von klinischen Proben analysiert werden kann. Sowohl bei der Selektion bestimmter Zellen als auch bei der Aufbereitung der DNA und der Messung der PCR-Produkte gestattet die Verwendung von Mikropartikeln eine komplette Automatisierung des Verfahrens. Diese wird nicht zuletzt aufgrund der bereits in der Routinediagnostik bewährten, auf Magnetseparation basierenden Robotiksysteme ermöglicht. Die Bearbeitung von Proben mit jenen Partikeln verläuft schneller und sicherer als konventionelle Verfahren. Ein wesentlicher Vorteil von Mikropartikeln gegenüber planaren Systemen wie dem ELISA-Verfahren liegt in einer vergrößerten Reaktionsoberfläche. Ferner sind die Partikel in der Lösung in Bewegung, so dass sich das Einfangen bestimmter Liganden verbessert. Dabei ist auf eine identische Bindefähigkeit verschiedener Partikelsorten zu achten oder es ist eine Berechnung mit einem Korrekturfaktor durchzuführen.

Auf Magnetseparation beruhende Robotiksysteme sind kommerziell erhältlich. Sie können eine enorme Menge von Proben parallel bearbeiten. Deren Ergebnisse können mit denen der Durchflußzytometrie erst nach Standardisierung des Verfahrens, die sich momentan noch in ihrer Entwicklungsphase befindet, verglichen werden.

4.3 Weitere Anwendungsbereiche

Der Einsatz der durchflußzytometrischen PCR-Produkt-Quantifizierung ist nicht auf die Genexpression und Bestimmung des Virus-Titers beschränkt, sondern auch auf eine posttherapeutische Diagnose der Leukämie oder den Nachweis genomischer Veränderungen übertragbar.

Ein weiterer zukünftiger Anwendungsbereich des Verfahrens könnte die multiple PCR-Analyse sein. Wie bereits für die kompetitive PCR und den Deletionsnachweis gezeigt, ist durch die Kombination von Anti-DIG- und Anti-DNP-Antikörpern die gleichzeitige Analyse von zwei PCR-Produkten möglich, vorausgesetzt, die beiden Partikelsorten sind im Durchflußzytometer unterscheidbar (Wedemeyer, persönliche Mitteilung).

Mit der Untersuchung des 'viral load' würde ein wichtiges Anwendungsgebiet hinzukommen. Bereits Smith et al. (1998) wiesen mehrere Virenarten nach PCR mit mehreren Partikelsorten im Durchflußzytometer nach.

Forderungen für die Untersuchung von Biomarkern in der klinischen Diagnostik werden von dem hier entwickelten Verfahren grundsätzlich erfüllt. Es ist in Hinblick auf Schnelligkeit, Einfachheit, Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit den meisten konventionellen Systemen überlegen und mit den derzeit besten kommerziellen Systemen durchaus vergleichbar. Bezüglich der Zuverlässigkeit kann die Methode durch optimierte Lagerungspuffer, die die Stabilität der Fluoreszenz-gefärbten Proben verlängern, verbessert werden. Weitere Optimierungen des Verfahrens könnten durch geeignetere Mikropartikel mit homogener Form und Struktur sowie durch die Verwendung eines grünen Lasers erreicht werden.

Literatur

1. **Abdolvahab-Emminger 1999:** H. Abdolvahab-Emminger (Hrsg.). Exaplan – Das Kompendium der klinischen Medizin. München, 1999.
2. **Alexander/Raettig 1998:** M. Alexander und H. Raettig. Infektionskrankheiten. Epidemiologie – Klinik – Immunprophylaxe. Stuttgart, 1998.
3. **Allen et al. 1995:** R.D. Allen, P.E. Pellett, J.A. Stewart und M. Koopmans. Nonradioactive PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Detection of Human Cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 725-728.
4. **Barber et al. 1999:** L. Barber, J.J. Egan, A.J. Turner, M. Guiver, A.A. Woodcock, N. Yonan, A.K. Deiraniya und A.J. Fox. The development of a quantitative PCR ELISA to determine HCMV DNAemia levels in heart, heart/lung and lung transplant recipients. *Journal of Virological Methods*, 1999, 82, 85-97.
5. **Brenner et al. 2000:** S. Brenner, S.R. Williams, E.H. Vermaas, T. Storck, K. Moon, C. McCollum, J.I. Mao, S. Luo, J.J. Kirchner, S. Eletr, R.B. DuBridge, T. Burcham, G. Albrecht. In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2000, 97, 1665-1670.
6. **Brown/Wittwer 2000:** M. Brown und C. Wittwer. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 2000, 46, 1221-1229.
7. **Dumont et al. 2001:** L.J. Dumont, J. Luka, T. VandenBroeke, P. Whitley, D.R. Ambruso und M.D. Elfath. The effect of leukocyte-reduction method on the amount of human cytomegalovirus in blood products: a comparison of apheresis and filtration methods. *Blood*, 2001, 97, 3640-3647.

8. Fabio et al. 1997: G. Fabio, S. N. Knight, I.M. Kidd, S.M. Noibi, M.A. Johnson, V.C. Emery, P.D. Griffiths und D.A. Clark. Prospective Study of Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 7, and Cytomegalovirus Infections in Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 2657-2659.
9. Fernandes et al. 1999: S.R.M. Fernandes, M.B. Bértolo, C.L. Rossi, A.M. Samara, S.H.A. Bonon, P. Durante und S.C.B. Costa. Polyarteritis Nodosa and Cytomegalovirus: Diagnosis by Polymerase Chain Reaction. *Clinical Rheumatology*, 1999, 18, 501-503.
10. Gerna et al. 1995: G. Gerna, M. Furione, F. Baldanti, E. Percivalle, P. Comoli und F. Locatelli. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients. *British Journal of Haematology*, 1995, 91, 674-683.
11. Gödde 1997: E. Gödde (Hrsg.). Fünferband Grundlagenfächer. Bad Wörishofen, 1997.
12. Göhde/Dittrich 1969: W. Göhde und W. Dittrich. Impulsfluorometrie von Einzelzellen in Suspension. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 1969, 24, 360-361.
13. Grundy et al. 1996: J.E. Grundy, A. Ehrnst, H. Einsele, V.C. Emery, H. Hebart, H.G. Prentice und P. Ljungman. A Three-Center European External Quality Control Study of PCR for Detection of Cytomegalovirus DNA in Blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 1166-1170.
14. Hamprecht et al. 1997: K. Hamprecht, E. Mikeler und G. Jahn. Semi-quantitative detection of cytomegalovirus DNA from native serum and plasma by nested PCR: influence of DNA extraction procedures. *Journal of Virological Methods*, 1997, 69, 125-135.
15. Herold 2000: G. Herold u.a. (Hrsg.). *Innere Medizin*. Köln, 2000.

16. Hick 1997: C. und A. Hick (Hrsg.). Physiologie. Stuttgart, 1997.
17. Krajden et al. 1996: M. Krajden, P. Shankaran, C. Bourke und W. Lau. Detection of Cytomegalovirus in Blood Donors by PCR Using the Digene SHARP Signal System Assay: Effects of Sample Preparation and Detection Methodology. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 29-33.
18. Kurz et al. 1997: S. Kurz, H.-P. Steffens, A. Mayer, J.R. Harris und M.J. Reddehase. Latency versus Persistence or Intermittent Recurrences: Evidence for a Latent State of Murine Cytomegalovirus in the Lungs. Journal of Virology, 1997, 2980-2987.
19. Mendez et al. 1998: J.C. Mendez, M.J. Espy, T.F. Smith, J.A. Wilson und C.V. Paya. Evaluation of PCR Primers for Early Diagnosis of Cytomegalovirus Infection following Liver Transplantation. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 526-530.
20. Nitsche 1999: A. Nitsche, N. Steuer, C.A. Schmidt, O. Landt und W. Siegert. Different Real-Time PCR Formats Compared for the Quantitative Detection of Human Cytomegalovirus DNA. Clinical Chemistry, 1999, 45, 1932-1937.
21. Physiologisch-chemisches Praktikum 1998: Anleitung zum physiologisch-chemischen Praktikum an der Justus-Liebig-Universität Gießen. 1998.
22. Oethinger 1997: M. Oethinger (Hrsg.). Mikrobiologie und Immunologie. Stuttgart, 1997.
23. Quirmbach 1998: G. Quirmbach und S. Müller. Medizinische Mikrobiologie. Stuttgart, 1998.
24. Roback et al. 2001: J.D. Roback, C.D. Hillyer, W.L. Drew, M.E. Laycock, J. Luka, E.S. Mocarski, B. Slobedman, J.W. Smith, C. Soderberg-Naucleer, D.S. Todd, S. Woxenius, M.P. Busch. Multicenter evaluation of PCR methods for detecting CMV DNA in blood donors. Transfusion, 2001, 41, 1249-1257.

25. Schmidt et al. 1995: C.A. Schmidt, H. Oettle, R. Peng, P. Neuhaus, G. Blumhardt, R. Lohmann, F. Wilborn, K. Osthoff, J. Oertel, H. Timm und W. Siegert. Comparison of polymerase chain reaction from plasma and buffy coat with antigen detection and occurrence of immunoglobulin M for the demonstration of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation*, 1995, 59, 1133-1138.
26. Schoppel et al. 1998: K. Schoppel, C. Schmidt, H. Einsele, H. Hebart und M. Mach. Kinetics of the Antibody Response against Human Cytomegalovirus-Specific Proteins in Allogeneic Bone Marrow Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases*, 1998, 178, 1233-1243.
27. Schumann et al. 1971: J. Schumann, F. Ehring, W. Göhde, W. Dittrich. Pulse cytophotometry of DNA in skin tumors. *Archives of Clinical and Experimental Dermatology*, 1971, 239, 377-389.
28. Shibata et al. 1988: D. Shibata, W.J. Martin, M.D. Appleman, D.M. Causy, J.M. Leedom und N. Arnheim. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 1988, 158, 1185-1192.
29. Slobedman/Mocarski 1999: B. Slobedman und E.S. Mocarski. Quantitative Analysis of Latent Human Cytomegalovirus. *Journal of Virology*, 1999, 73, 4806-4812.
30. Steinkamp et al. 1982: J.A. Steinkamp, J.S. Wilson, G.C. Saunders, C.C. Stewart. Phagocytosis: flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres. *Science*, 1982, 215, 64-66.
31. Stewart/Steinkamp 1982: C.C. Stewart und J.A. Steinkamp. Quantitation of cell concentration using the flow cytometer. *Cytometry*, 1982, 2, 238-243.

32. **Tanabe et al. 1996:** K. Tanabe, K. Takahashi, I. Koyama, K. Sonda, S. Fuchinoue, T. Kawai, T. Tokumoto, S. Koga, T. Naito, T. Yagisawa, H. Toma, K. Ota und H. Nakayima. Early Diagnosis of CMV Syndrome After Kidney Transplantation: Comparison Between CMV Antigenemia and PCR Assay. *Transplantation Proceedings*, 1996, 28, 1508-1510.
33. **Taylor-Wiedeman 1991:** Taylor-Wiedeman u.a. *Journal of General Virology*, 1991, 72, 2059-2064.
34. **Toyoda et al. 1995:** M. Toyoda, X.M. Zhang, Z. Sun, L. Czer, A. Trento und S.C. Jordan. Use of Polymerase Chain Reaction to Rapidly Detect Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood Leukocytes of Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*, 1995, 27, 1272-1273.
35. **Wedemeyer et al. 2000:** N. Wedemeyer, W. Göhde und T. Pötter. Flow Cytometric Analysis of Reverse Transcription-PCR Products: Quantifikation of p21^{WAF1/CIP1} and Proliferating Cell Nuclear Antigen mRNA. *Clinical Chemistry*, 2000, 46, 1057-1064.
36. **Wedemeyer/Pötter 2001:** N. Wedemeyer und T. Pötter. Flow cytometry: an 'old' tool for novel applications in medical genetics. *Clinical Genetics*, 2001, 60, 1-8.
37. **Wedemeyer et al. 2002:** N. Wedemeyer, T. Pötter, S. Wetzlich, W. Göhde. Flow cytometric quantification of competitive reverse transcription PCR products. *Clinical Chemistry*, 2002, 48, 1398-1405.
38. **Wolf/Spector 1993:** D.G. Wolf und S.A. Spector. Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma. *Transplantation*, 1993, 56, 330-334.
39. **Zimmermann/Mannhalter 1996:** K. Zimmermann und J.W. Mannhalter. Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques*, 1996, 21, 268-272.

*Hiermit möchte ich allen herzlich danken,
die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.*

Lebenslauf

Name: Karin Sabine Oguntke

Geburtsdatum: 20.01.1969

Geburtsort: Gadderbaum – jetzt Bielefeld

Eltern: Brigitte Oguntke (geb. 1934)
Manfred Oguntke (geb. 1937, gest. 1985)

Konfession: evangelisch

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Ausbildung/Beruf:

1975 – 1979	Brüder-Grimm-Grundschule, Bielefeld
1979 – 1988	Hans-Ehrenberg-Gymnasium, Bielefeld
1988 – 1992	Studium der Fächer Mathematik und Biologie für das Lehramt der Sekundarstufe I, Bielefeld
1992 – 1994	Referendariat am Studienseminar Paderborn
1995 – 1997	Lehrerin an der Hauptschule, Bad Oeynhausen
1992 – 1997	Studium der Pädagogik/Diplom, Bielefeld
1997 – 2002	Studium der Medizin, Gießen und Münster
2002 – 2003	Praktisches Jahr, Bielefeld
2003 – 2004	Ärztin im Praktikum/Augenheilkunde, Detmold
2004 – 2005	Assistenzärztin/Augenheilkunde, Detmold

Bielefeld, 26. September 2005

Sabine Oguntke