

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der
Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. K. Pfeffer

**Entwicklung und Etablierung einer TaqMan Real Time PCR zur
Verbesserung und Vereinfachung der Diagnostik der urogenital
relevanten Krankheitskeime *U. urealyticum*, *U. parvum*,
M. hominis und *M. genitalium***

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wibke Brenneisen

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan:	Univ.- Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg
Referentin:	PD Dr. Birgit Henrich
Korreferentin:	PD Dr. Monika Hampl

Für meine Eltern

Inhalt

1. <u>Einleitung</u>	1
1.1 Eigenschaften der Mollicutes	1
1.2 Vorkommen	2
1.3 Morphologie	3
1.4 Pathogenese und Virulenzfaktoren	4
1.5 Urogenitale Erkrankungen durch Mycoplasmen und Ureaplasmen	6
1.6 Therapie	7
1.7 Mycoplasmendiagnostik	8
1.8 Nachweis von urogenital relevanten Krankheitskeimen mittels Real Time PCR	9
2. <u>Material und Methoden</u>	12
2.1 <u>Material</u>	12
2.1.1 Chemikalien	12
2.1.2 Primer und Sonden	13
2.1.3 Master Mix	13
2.1.4 Enzyme	13
2.1.5 Bakterienstämme	14
2.1.6 Klonierungsvektor	15
2.1.7 Marker	15
2.2 <u>Methoden</u>	16
2.2.1 DNA-Isolierung	16
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	16
2.2.2 Klonierung	16
2.2.2.1 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	16
2.2.2.2 DNA-Restriktion	17
2.2.3 Lagerung von Bakterien	17
2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	17
2.2.5 Konzentrationsbestimmungen	17
2.2.5.1 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	17
2.2.5.2 Keimzahlbestimmung von <i>E. coli</i> -Bakterien	18
2.2.5.3 Bestimmung der Bakterienanzahl mittels CCU	18

2.2.6	Bakterienkultivierung	18
2.2.6.1	Herstellung von Flüssigkulturmedien	18
2.2.6.2	Kultivierung von Mycoplasmen und Ureaplasmen	19
2.2.7	Varianten der DNA-Aufbereitung	19
2.2.7.1	DNA-Aufschluß I	19
2.2.7.2	DNA-Aufschluß II	19
2.2.7.3	DNA-Aufschluß III (Proteinase-K-Verdau)	20
2.2.7.4	DNA-Aufschluß IV	20
2.2.8	Urease nachweis	20
2.2.9	Polymerasekettenreaktion	20
2.2.9.1	Real Time PCR	20
2.2.9.2	Konventionelle PCR	21
2.2.10	Sequenzierung	22
2.2.11	Verwendete Analyseprogramme	22
3.	<u>Ergebnisse</u>	23
3.1	RealTime PCR als Alternative zur kulturellen Diagnostik	23
3.2	Das humane GAPDH-Gen als Positivkontrolle	27
3.3	Design der Taq Man PCRs zum Nachweis urogenital-relevanter Keime	29
3.4	Die Quantifizierung der PCR	31
3.5	Evaluation verschiedener Probenaufschlussverfahren	33
3.6	Evaluierung der PCR	39
3.7	Neukonzeption der <i>M.hominis</i> -PCR	41
3.8	Validierung der PCR unter Einsatz von Patientenmaterial	45
3.9	Korrelation zwischen nachgewiesener Mycoplasmenspezies und Krankheitssymptomen	46

4. <u>Diskussion</u>	48
5. <u>Zusammenfassung</u>	55
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	57
7. <u>Abkürzungsverzeichnis</u>	66
8. <u>Danksagung</u>	67
9. <u>Lebenslauf</u>	68

1. Einleitung

1.1 Eigenschaften der Mollicutes

Mycoplasmen und Ureaplasmen sind Prokaryonten, die sich durch ihre geringe Größe, das Fehlen einer Zellwand, den meist niedrigeren Guanin-Cytosin-Gehalt ihrer DNA sowie durch den Cholesteringehalt ihrer Membran von anderen Bakterien unterscheiden. Die erste Mycoplasmaspezies wurden 1898 von Pleuropneumonie-kranken Rindern isoliert, weshalb sie daher lange als PPLO (pleuropneumonia-like-organisms) bezeichnet wurden (5).

Taxonomisch sind diese „Zellwandlosen“ in der Klasse der *Mollicutes* („Weichhäuter“) zusammengefasst, die sich in die vier Ordnungen der Mycoplasmatales, Entomoplasmatales, Acholeplasmatales, und Anaeroplasmatales aufspaltet (1, 21).

Die Spezies *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) und *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) werden der Gattung *Mycoplasma*, *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) und *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) der Gattung *Ureaplasma* zugeordnet, die wiederum in der Familie der *Mycoplasmataceae* zusammengefasst sind (siehe Abbildung 1.1).

Klassifikation	Bekannte Arten	Genomgröße (kb)	Vorkommen
Ordnung I: Mycoplasmatales			
Familie I: Mycoplasmataceae			
Gattung I: Mycoplasma	102	580-1350	Mensch, Tier
Gattung II: Ureaplasma	6	760-1170	Mensch, Tier
Ordnung II: Entomoplasmatales			
Familie I: Entomoplasmataceae			
Gattung I: Entomoplasma	5	790-1140	Insekten, Pflanzen
Gattung II: Mesoplasma	12	870-1100	Insekten, Pflanzen
Familie II: Spiroplasmataceae			
Gattung I: Spiroplasma	33	780-2220	Insekten, Pflanzen
Ordnung III: Acholeplasmatales			
Familie I: Acholeplasmataceae			
Gattung: Acholeplasma	13	1500-1650	Tiere, Insekten
Ordnung IV: Anaeroplasmatales			
Familie: Anaeroplasmateceae			
Gattung I: Anaeroplasma	4	1500-1600	Rind
Gattung II: Asteroleplasma	1	1500	Rind

Abb. 1.1: Taxonomie der Mollicutes

1.2 Vorkommen

Mycoplasmen und Ureaplasmen sind weit verbreitete Parasiten von Mensch, Tier und Pflanze. Sie besitzen eine relativ strenge Wirtsspezifität. Die Ursachen liegen wohl hauptsächlich in ihrer Anpassung an den jeweiligen Wirt (Spezifität in Erkennung von Rezeptoren und Epitopen). Die meisten Mycoplasmenarten, die den Menschen besiedeln, sind im Respirationstrakt oder im Urogenitalsystem zu finden. Sie werden durch Tröpfcheninfektion oder durch direkten Kontakt übertragen. Viele Mycoplasmenarten gehören zur normalen Flora des jeweiligen Bereichs (21), was in Tabelle 1.3 veranschaulicht wird, einige sind jedoch – zumindest fakultativ- pathogen.

Vorkommen	Mycoplasmenspezies	Normale Flora
Respirationstrakt	<i>M. pneumoniae</i>	Nein
	<i>M. orale</i>	Ja
	<i>M. salivarium</i>	Ja
	<i>M. faucium</i>	Ja
	<i>M. buccale</i>	Ja
	<i>M. fermentans</i>	Nein
	<i>M. lipophilum</i>	Ja
Urogenitaltrakt	<i>M. hominis</i>	(Nein)
	<i>U. urealyticum</i>	(Nein)
	<i>U. parvum</i>	(Nein)
	<i>M. genitalium</i>	Nein
	<i>M. penetrans</i>	Nein
	<i>M. spermatophilum</i>	Ja
	<i>M. primatum</i>	Ja

Tab. 1.3: Häufigste Mycoplasmenarten des Menschen (21)

Auf der anderen Seite wurde im Zusammenhang mit der immer größer werdenden Zahl an Patienten, die entweder an einer Immunschwäche wie z.B. AIDS oder der Hypogammaglobulinämie erkrankt sind, oder die eine Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten erhalten, über eine Besiedelung mit Mycoplasmen berichtet, die vom normalen Lebensraum abweicht. So wurden Mycoplasmen und Ureaplasmen aus dem Blut

von AIDS-Patienten isoliert; und bei anderen immunkompromittierten Patienten fand man die im Normalfall den Urogenitaltrakt besiedelnden *Mollicutes M. hominis* und *U. urealyticum* in Respirationstrakt und Gelenkflüssigkeit, was wiederum in diesen Organen zu Entzündungsreaktionen führte (2).

In Wissenschaft und Forschung stellen Mycoplasmen ein weiteres Problem in der Infektion von Zellkulturen dar (3). Sehr viele permanente Zelllinien sind mit Mycoplasmen kontaminiert. Diese stammen entweder vom Menschen (*M. orale*) oder aus Bestandteilen der Kulturmedien (z.B. *M. arginini* aus Rinderserum, *M. hyorhinis* aus Trypsinlösungen), die üblicherweise nur sterilfiltriert werden. Die zellwandlosen Mycoplasmen können aufgrund ihrer Plastizität selbst Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm passieren. Da eine Mycoplasmenkontamination häufig keine auffallenden Veränderungen der befallenen Zellen verursacht, wie z.B. eine Trübung des Kulturmediums, und zu klein sind, um mikroskopisch detektierbar zu sein, kann ihre Anwesenheit lange unbemerkt bleiben. Die parasitierenden Mycoplasmen können jedoch die biochemischen Eigenschaften der Zellen und ihr Verhalten gegenüber Viren erheblich beeinflussen. Manche Befunde früherer Jahre, in denen die Mycoplasmenfreiheit der charakterisierten Zelllinien nicht nachgewiesen worden war, sind daher von fraglichem Wert (5). Mycoplasmen können darüber hinaus zu Veränderungen an den Chromosomen der infizierten Zellen führen (5) oder z.B. Lymphozyten unspezifisch stimulieren (1). Als Ursache kommen dafür u.a. der Verbrauch von Arginin, die Konkurrenz um Nukleinsäurebausteine und die Wirkung von Mycoplasmen-eigenen Nukleasen in Frage. (5).

1.3 Morphologie

Da Mycoplasmen nur eine Zellmembran besitzen und diese zugleich sehr flexibel ist, können sie unter Mitwirkung eines - noch wenig charakterisierten- Zytoskelettes ihre Gestalt verändern und sehr verschiedene Formen annehmen. Häufigste Grundform ist die kokkoide Zelle (1). Viele *Mollicutes* exprimieren zusätzlich filamentöse Strukturen an ihrer Oberfläche. Für *M. pneumoniae* wurde sogar ein chemotaktisches Verhalten beschrieben. Die dafür verantwortlichen Strukturgene konnten jedoch trotz vollständig sequenziertem Genom nicht identifiziert werden (4). Die Entschlüsselung des *M. pneumoniae* Genoms ermöglichte jedoch die Identifizierung und molekulare Charakterisierung von Proteinkomplexen des Zytoskelettes. Einige Proteine dienen als oberflächen-exprimierte Adhäsine, während andere als akzessorische Proteine die Anordnung bzw. Verteilung dieser Adhäsine erhalten (1).

Das Fehlen einer Zellwand beeinflusst das Verhalten der Mycoplasmen auch in anderer Hinsicht: sie sind filtrierbar durch üblicherweise bakteriendichte Filter, resistent gegen zellwandwirksame Antibiotika und empfindlich gegen homologes Antiserum (Wachstumshemmtest) (5). Die Zellstruktur ist besonders einfach gestaltet, d.h. mit einer trilaminären Zytoplasmamembran als äußere Hülle und einem Zytoplasma, welches Ribosomen und eine doppelsträngige, zirkuläre DNA als Chromosom enthält. Von der anderer Bakterien unterscheidet sich die Mycoplasmenmembran durch ihren Gehalt an Cholesterin (13). Das Genom der Mycoplasmen hat charakteristischerweise einen niedrigen G+C-Gehalt.

Die Art der Reproduktion unterscheidet sich nicht von der anderer Prokaryonten, wobei die Faktoren, die die Zellteilung bei Mycoplasmen koordinieren, noch unbekannt sind. Sie vermehren sich durch Zweiteilung ihres ringförmigen Chromosoms, gefolgt von der Trennung der Tochterzellen, welche durch Konstriktion der Membran an der Trennstelle erfolgt. Die wichtigsten biologischen Eigenschaften, verglichen mit anderen Bakterien, sind in Tabelle 1.2 dargestellt.

Eigenschaft	Mycoplasmen	andere Bakterien
Zellwand	nein	ja
Filtrierbarkeit (450 nm)	ja	nein
Genomgröße	580-2200 kbp	1050 - >10000 kbp
Basenzusammensetzung (G+C mol %)	23-40	25-75
UGA Codon	Tryptophan-Codon	Stop-Codon

Tab 1.2: Differenzierungsmerkmale von Mycoplasmen und anderen Bakterien

1.4 Pathogenese und Virulenzfaktoren

Mycoplasmen leben je nach Spezies als ernstzunehmende Pathogene (z.B. *M. pneumoniae*), fakultative Pathogene (z.B. *M. hominis*) oder Kommensalen (z.B. *M. orale*; *M. salivarium*). Infektionen mit humanpathogenen Mycoplasmen sind bei Menschen mit normalem Immunstatus selten fulminant, sie rufen eher chronische Erkrankungen hervor. Man kann die fakultativ-pathogenen Mycoplasmen als „ideale Parasiten“ bezeichnen, die normalerweise in Harmonie mit ihrem Wirt leben (1). Eine Beteiligung an bisher ätiologisch ungeklärten

Krankheiten wie z.B. Morbus Crohn, Arthritiden, AIDS oder auch an dem Golf-Kriegs-Syndrom, wird noch diskutiert (10).

Die molekulare Basis der Pathogenität von Mycoplasmen ist schwer fassbar.

Geringe Größe, Verformbarkeit, und besondere Adhärenzmechanismen verleihen den Mycoplasmen die Fähigkeit, sich eng an die Membranen der Wirtszelle anzuheften. Die mukösen Oberflächen besiedelnd können dann Pathogenitätsfaktoren wie H_2O_2 (auch Hämolyysin genannt), Proteasen, Ureasen und Nukleasen wirksam werden und Wirtszellschäden verursachen, wobei deren Rolle bei einer Infektion noch nicht vollständig geklärt ist.

Auf der anderen Seite versuchen die Erreger auf verschiedene Weise (z.B. durch Antigenvariation), die Immunreaktion des Wirtes zu umgehen. Bereits durch ihre vorherrschende Oberflächenlokalisation sind sie für die Immunmechanismen schwer erreichbar (1). Mycoplasmen üben eine mitogene Wirkung auf Lymphozyten sowie eine antiphagozytäre und immunsuppressive Wirkung aus. Die Interaktion von Mycoplasmen mit Makrophagen induziert die Bildung verschiedener proinflammatorischer Zytokine (verschiedene Interleukine, $TNF-\alpha$ und γ) (1). Diese Immunreaktionen führen zu immunpathologischen Veränderungen im infizierten Gewebe. Durch die Zytokinwirkung und die Immunkomplexe werden entzündliche Reaktionen provoziert. Diese massive Proliferation von Lymphozyten verändert die Organfunktion (z.B. bei Pneumonien durch Infiltration) erheblich.

Die bei Ureaplasmen vorkommende Urease setzt Harnstoff zu Ammoniak um und kann als Virulenzfaktor in Betracht gezogen werden (11). In Folge einer Ureaplasmeninfektion fand man bei Rindern zudem eine signifikante Abnahme von Prostaglandin E_2 und F_{2a} in Zellen des Endometriums. Prostaglandine halten auch beim Menschen eine bestehende Schwangerschaft aufrecht und sind zur Implantation der befruchteten Eizelle in die Gebärmutter Schleimhaut relevant. Ureaplasmen können mithilfe ihrer Phospholipase A_2 die Prostaglandinproduktion stören (12). So ist nicht verwunderlich, dass bei vorzeitiger Wehentätigkeit und positivem Ureaplasmenachweis eine Therapie mit Erythromycin, für das Ureaplasmen in der Regel sensibel sind, oft zur Symptombefreiung der Patientin führte. Als weitere Pathogenitätsfaktoren von Mycoplasmen werden toxische Bestandteile der Membran und antiphagozytäre Oberflächensubstanzen diskutiert. Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Mycoplasmeninfektion kommt der Wirtsreaktion zu. Sie kann Schwere und Verlauf der Erkrankung entscheidend beeinflussen (5).

1.5 Urogenitale Erkrankungen durch Mycoplasmen und Ureaplasmen

Definitionsgemäß ist der innere Schließmuskel der Harnröhre die Grenze zwischen einer isolierten Infektion der Harnröhre (Urethritis) und höher gelegenen Infektionen. Etwa 5% der Frauen haben eine asymptomatische Bakteriurie, die, wenn sie nicht behandelt wird, in einem Drittel aller Schwangerschaften zu einer akuten Nierenbeckenentzündung führt.

Harnblasenentzündungen stellen die häufigste Ursache der Arbeitsunfähigkeit bei Frauen dar. Diese hohe Inzidenz von Harnwegsinfektionen bei Frauen hat anatomische Gründe: kurze Harnröhre in unmittelbarer Nähe zur kontaminierten Analregion (6).

Bei Männern treten Harnwegsinfektionen erst im höheren Alter gehäuft auf und haben dann überwiegend obstruktive Ursachen (z.B. Prostataerkrankungen).

Urogenital-relevante Mycoplasmen und Ureaplasmen werden durch sexuellen Kontakt übertragen. Die Häufigkeit der normalen Besiedlung (bis zu 60%) hängt vom Alter, von sozialer Zugehörigkeit und von den Sexualgewohnheiten ab. Promiskuität hat eine vermehrte Besiedlung zur Folge. Bei Infektionen des oberen Harntraktes kommen die Erreger aus dem Keimreservoir des Genitalbereiches. Das Neugeborene infiziert sich in der Regel bei der Geburt.

Die Komplikation der aufsteigenden Infektion besteht bei Männern in einer Infektion der Prostata und Samenblase, bei Frauen in der Entzündung von Gebärmutter, Eileitern und Eierstöcken (6). Die aufsteigende Entzündung bei Frauen wird durch bestimmte Gegebenheiten beeinflusst. So besteht z.B. während und kurz nach der Menstruation, nach einem Schwangerschaftsabbruch, nach der Geburt, nach operativen Eingriffen der Gebärmutter und beim Tragen von Intrauterinpressaren ein erhöhtes Risiko. Die häufigste primäre Manifestation des Infekts ist die Eileiterentzündung. Die Aszension der pathogenen Keime löst dort eine entzündliche Schleimhautreaktion aus, welche frühzeitig zum reaktiven Verschluss der Tubenenden führen kann, was eine Infertilität begünstigt (7). Breitet sich die Entzündung in das umliegende Gewebe aus, kann es zu Verwachsungen zwischen Eileitern, Eierstöcken, Darm und Beckenwand kommen, wobei sich in der Folge oft Zysten ausbilden, die wiederum nicht selten Anlass eines diagnostisch-therapeutischen Eingriffs sind.

Ureaplasmen sind im Genitaltrakt des Mannes vor allem Erreger von nicht-gonorrhöischer Urethritis und Prostatitis (20,21,41). Die typischen Symptome einer Urethritis sind Harnröhrenausfluss, Jucken, Brennen oder Schmerzen beim Wasserlassen. Beweisend für eine Urethritis sind mikroskopisch > 4 Leukozyten/ Gesichtsfeld bei 1000facher

Vergrößerung im Sekretaustriech oder >15 Leukozyten bei 400facher Vergrößerung im Sediment von 3ml Ersturin. Semiquantitativ beweisend sind > 10⁴ Keime/ml im Urethralfluor oder 10³ Keime im Ersturin (8).

Ureaplasmen stehen im Verdacht, bei Schwangeren zu Frühgeburtslichkeit zu führen und bei Frühgeborenen eine Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) auslösen zu können.

Im weiblichen Genitaltrakt werden Ureaplasmen und *M. hominis* bei Bartholinitis, Salpingitis, tubo-ovariellen Abszessen, DOUGLAS-Abszessen, Purperal-Infektionen, Infektionen post abortum sowie bei milden Septikämien nach Aborten und Frühgeburten isoliert (22, 28, 41). Beide Erreger werden auch bei der Chorioamnionitis mit fetaler Infektion gefunden (23). Untersucht wird die Besiedlung der Vagina (Vaginose, Kolpitis) durch *M. hominis* (42) und die eventuell daraus resultierende Entstehung von intraepithelialen Neoplasien der Cervix (27). Bei Neugeborenen kann *M. hominis* gelegentlich leichte und schwere Infektionen bis hin zur Meningitis hervorrufen (29).

In Blase und oberem Harntrakt lassen sich bei 10-15% der Pyelonephritis-Fälle Mycoplasmen, vor allem Ureaplasmen nachweisen. Die Keimzahlen sind allerdings meist niedrig, die klinische Bedeutung ist noch ungeklärt.

M. genitalium gilt ebenfalls als Erreger der Urethritis, da schon 1993 in klinischen Studien eine signifikant höhere Zahl von *M. genitalium* bei Männern mit Urethritis gefunden wurde (17,18). Zudem verursacht *M. genitalium* bei Frauen Endometritis, Salpingitis, Cervizitis und Entzündungen des kleinen Beckens (Pelvic Inflammatory Disease) (24, 25, 26).

Differentialdiagnostisch sind als Ursache von urogenitalen Infektionen neben Bakterien, Pilzen und Parasiten (Trichomonas), vor allem Chlamydien, aber auch Viren der Herpesgruppe in Betracht zu ziehen.

1.6 Therapie

Bei Mycoplasmeninfektionen sind alle Therapeutika unwirksam, die ihren Angriffspunkt an der Zellwand haben (z.B. Beta-Laktam-Antibiotika). Tetrazykline (z.B. Doxycyclin) wirken bei allen Mycoplasmenarten, sind daher häufig Mittel der Wahl bei erwachsenen Patienten. Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit finden Makrolide (z.B. Erythromycin) breite Anwendung in der Kinderheilkunde. Auch neuere Gyrasehemmer (z.B. Ciprofloxacin) sind wirksam. Alle anderen Antibiotika werden in der Therapie meist nicht verwendet.

Eine Partnerbehandlung ist bei urogenitalen Infektionen unbedingt zu empfehlen.

1.7 Mycoplasmendiagnostik

Geeignete Untersuchungsmaterialien in der Mycoplasmendiagnostik sind Speichel, Sputum, Nasenschleim, Pleurapunktat (bei respiratorisch relevanten Mycoplasmen), Urin, Urethral-, Zervikal-, Vaginalabstriche (bei den urogenital-relevanten Mycoplasmen) und Serum.

Der mikroskopische Nachweis von Mycoplasmen ist kaum möglich, da ihre Größe mit 0,3-0,8 µm für konventionelle, in der Bakteriologie verwendete Mikroskope zu gering ist. Aus dem gleichen Grund hat sich die direkte Immunfluoreszenz bisher nicht bewährt.

Antigennachweise mit enzymimmunologischen Methoden sind dagegen experimentell bereits erprobt (5).

Als klassische Methode, Mycoplasmen nachzuweisen, dient die kulturelle Anzucht. Hier stehen sowohl Festnährböden als auch Flüssigmedien zur Verfügung. Auf den Nährböden bilden sie kleine Kolonien, die einen Durchmesser von 1mm erreichen können. Im Zentrum der Kolonie wachsen die Bakterien tiefer in den Nährboden hinein, sodass diese Stelle optisch dichter erscheint, in der Peripherie liegen sie nur in einer dünnen Schicht auf und wirken so durchscheinend. Das verleiht den Kolonien die typische, spiegelartige Form. Mycoplasmen wachsen im Allgemeinen unter aeroben und anaeroben Bedingungen, wobei die anaerobe Anzucht in der Regel die besseren Ergebnisse zeigt (5).

Aufgrund der begrenzten biosynthetischen Fähigkeiten der Mycoplasmen benötigen sie ein nährstoffreiches Kulturmedium. Tierische Proteine oder Peptonmischungen in Kombination mit einem Hefeextrakt sind dafür geeignet. Des Weiteren benötigen Ureaplasmen und Mycoplasmen Steroide, wie z.B. Cholesterol, die im Pferdeserum enthalten sind. Pferdeserum liefert auch die zur Membransynthese nötigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren (59). Bei den Flüssignährmedien macht man sich biochemische Eigenschaften der Mycoplasmen und Ureaplasmen zunutze. Mycoplasmen können Glucose fermentieren (*M. genitalium* und *M. pneumoniae*) und die im Medium enthaltene Aminosäure Arginin mittels ihrer Arginin-Dihydrolase (*M. hominis*) abbauen, Ureaplasmen hydrolysieren Harnstoff. Der Umsatz von Arginin und Harnstoff führt über das gebildete Ammoniak zur Alkalisierung des Medium, welches durch Farbveränderung des Indikators Phenolrot von gelb nach rot sichtbar wird (59).

Die Identifizierung einer Mykoplasmenspezies erfordert sehr komplexe Verfahren einschließlich biochemischer und enzymatischer Analysen, Erfassung von bestimmten physiologischen Eigenschaften und Verwendung verschiedener serologischer Methoden

(Wachstumshemmtest, Kolonie-Immunfluoreszenz, metabolische Inhibition). Für diagnostische Zwecke finden folgende Verfahren Anwendung. In der ersten Phase wird die Gattungszugehörigkeit aufgrund der Sterolabhängigkeit und der Ureasebildung bestimmt, dann wird eine grobe Einteilung in Glukose- bzw. Arginin-verstoffwechselnde Stämme vorgenommen. Die Schlussidentifikation erfolgt gezielt durch Immunfärbung der Kolonien mit einem Spezies-spezifischen Antikörper oder durch den Wachstumshemmtest (14).

Als gängige Nachweismethode von *Mycoplasma pneumoniae* dient die serologische Diagnostik. Eine Mycoplasma-Infektion hinterlässt in der Regel eine ausreichende Immunität gegen eine Neuinfektion. Bei systemischen oder Organ-spezifischen Infektionen werden humorale Antikörper (IgG) gebildet, die mit verschiedenen serologischen Verfahren (ELISA, Agglutination, Hämagglutination oder Komplementbindungsreaktion (KBR)) erfasst werden.

1.8 Nachweis von urogenital relevanten Krankheitskeimen mittels Real Time PCR

Urinproben machen im mikrobiologischen Labor den größten Probenanteil aus, da beispielsweise der Harnwegsinfekt die häufigste urologische Infektion im ambulanten und klinischen Bereich darstellt. Ebenfalls sind 1/3 aller nosokomialen Infekte Harnwegsinfekte (30). Deutlich seltener, aber immer noch in einem nicht zu verachtenden Anteil werden Urethralabstriche, Zervikalabstriche, Prostataexprimat oder auch Ejakulat mikrobiologisch untersucht.

Als Standardverfahren zum Nachweis urogenital relevanter Mycoplasmen gilt der kulturelle Nachweis (s. Kap. 1.6), wobei sich *M. hominis* und *Ureaplasma spp.* nur auf Spezial-Nährböden anzüchten lassen; der kulturelle Nachweis von *M. genitalium* ist sogar so langwierig, dass er in der Diagnostik keine Anwendung findet (30).

Im Hinblick auf den hohen Material- und Zeit-Bedarf bei der kulturellen Mycoplasmendiagnostik sollte man alternative Nachweismethoden in Betracht ziehen. Für die Kultur von anspruchsvollen und schwer anzüchtbaren Erregern wie es die Mycoplasmen und Ureaplasmen sind, benötigt man 2-7 Tage. Schließt sich eventuell eine erneute Anzucht zur Bestimmung des Resistenzprofils bei schwerwiegenden Infektionen an, rechnet man mit der doppelten Zeit. Klinisch resultiert daraus der Nachteil, dass das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung selten abgewartet werden kann und somit stets zunächst eine empirische Antibiotikatherapie in Kauf genommen werden muss (30).

Zudem benötigt man in der kulturellen Anzucht ausreichend viel Erregermaterial. Ist dies nicht gewährleistet, könnten molekularbiologische Nachweismethoden den Vorteil erbringen, dass sie sehr viel sensitiver sind. Eines dieser Verfahren ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Sie beruht auf dem Nachweis einer erregerspezifischen Nukleinsäuresequenz, die *in vitro* mit Hilfe einer DNA-Polymerase vervielfältigt wird.

In den Anfängen der molekulargenetischen Diagnostik der Mycoplasmen und Ureaplasmen benutzte man eine **konventionelle PCR**, wie sie Anfang der 1980er Jahre von Kary Banks Mullis entwickelt wurde (55). Sowohl für Ureaplasmen als auch für *M. hominis* und *M. genitalium* sind Detektionsmethoden für die konventionelle PCR beschrieben (32, 60, 61). Da man die oben genannten Nachteile dieser Methode erkannte, versuchte man die PCR weiterzuentwickeln, um sie noch sensitiver und einfacher in der Handhabung zu machen.

Am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der HHU Düsseldorf wurde eine **Nested-PCR** entwickelt, die den simultanen Nachweis von sieben Urethritis-relevanten Krankheitskeimen in einem Ansatz ermöglichen sollte (16). In diesem Verfahren wurde als zu amplifizierendes Zielgen ein House-keeping Gen gewählt, welches in allen Organismen vorkommt, aber zugleich auch spezies-spezifische Bereiche aufweist, die als Zielorte für die jeweiligen Primer ausgewählt wurden. Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurden zwei Polymerasekettenreaktionen nacheinander durchgeführt, was als „Nested-PCR“ bezeichnet wird. Hierbei dient das PCR-Produkt der ersten PCR als Matritze für die zweite, wobei die Bindungsstellen des Primerpaares der zweiten Reaktion in der amplifizierten Region zwischen den Primern der ersten Reaktion liegen. Diese Nested-PCR erwies sich jedoch als ein für die Diagnostik ungeeignetes Verfahren, da sich ab fünf nachzuweisenden Erregern zu viele Primer im Ansatz befanden, die zu unspezifischen Nebenreaktionen führten und durch die gelelektrophoretische Analyse der entstandenen Amplikons auch ein hohes Kontaminationsrisiko der Laborräume mit Amplikons trug.

Eine Alternative zur Nested-PCR stellt die **Real Time PCR** dar, die ebenfalls spezies-spezifisch und sensitiv den simultanen Nachweis mehrerer Spezies ermöglicht und durch online-Messung (mithilfe der Software des Realtime-PCR-Gerätes) der Fluoreszenzzunahme, die proportional zur Zunahme an amplifizierter DNA ist, den Vorteile bietet, dass keine Nachanalytik der Amplikons mehr erforderlich ist und somit eine geringere Kontaminationsanfälligkeit besteht. Durch Auswahl kurzer Amplikons ist zudem die Schnelligkeit der Diagnostik im Vergleich zur kulturellen Anzucht deutlich zu steigern. Da die RealTime PCR im Mikrotiterplattenformat die simultane Amplifikation von Standards

bekannter Konzentration ermöglicht, ist darüber hinaus eine Quantifizierung der in der Probe vorliegenden Genomäquivalente möglich. Dies war insbesondere bei den urogenital-relevanten Mycoplasmen und Ureaplasmen entscheidend, da diesen Erregern erst bei höheren Keimzahlen eine ätiologische Rolle zugeschrieben wird.

Laut Literatur findet die RealTime PCR in der Diagnostik der Ureaplasmen (51), *M. hominis* (42) sowie *M. genitalium* (18, 43) bereits Anwendung.

Eine „Weiterentwicklung“ der RealTime PCR stellt die **Multiplex PCR** dar. Mit diesem Verfahren können simultan mehrere Erreger in einem Ansatz nachgewiesen werden.

Blaylock und Mitarbeiter (43) etablierten eine solche Multiplex PCR für die *M. genitalium*-Diagnostik, wobei hier in einem Ansatz das *gyrA*-Gen von *M. genitalium* sowie das menschliche RNase-P-Gen detektiert wurden.

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung und Vereinfachung der Diagnostik der urogenital relevanten Krankheitskeime *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis* und *M. genitalium* durch die Entwicklung und Etablierung einer TaqMan Real Time PCR.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose	Biozym
Arginin	Sigma
Borsäure	ICN Biomedicals
Bromphenolblau	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
EDTA	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll Type 400	Serva
Glukose	Merck
Glycerin	Merck
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	Gibco BRL
Hepes	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Multi-Microbe Media	Virotech
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad
Natriumhydroxid	Merck
Natriumsulfit	Merck
OPA (One Phor All)-Puffer	Amersham
PPLO-Broth	Difco
Pferdeserum	Gibco BRL
Phenolrot	Sigma
Salzsäure	Merck
Tris (hydroxymethylaminomethan)	Merck
TSB (Tryptic Soy Broth)	Difco

2.1.2 Primer und Sonden

Spezies	Zielgen	Accession-Nr.	Primer/Sonde	Sequenz	Firma	Größe
<i>U.urealyticum</i>	Urease B	AF085720	Uu-for	1602-TGG CAC AGA TTG CGC ATA AT-1621	MWG	20 nt
			Uu-rev	1653-TGG AAC GAT CAT TTG TGT TTC AG-1675	MWG	23 nt
			Uu-Sonde*	1623-TAG GTA ATC GTC ATA TGC CTG CTC A-1647	Eurogentec	25 nt
<i>U.parvum</i>	Urease B	AF085733	Up-for	133-AGG AAA TGA AGA TAA AGA ACG CAA A-157	MWG	25 nt
			Up-rev	182-AAC GAA TAG CAG TAC CTG ATG GAA T-206	MWG	25 nt
			Up-Sonde*	159-TTG CTT ATG GAC GAC GTT TCG A-180	Eurogentec	22 nt
<i>M.hominis</i>	Lysyl t-RNA Synthetase	X74912	Mh-for	669-TCA TTG AAA CCG TTG CCT GAT-689	MWG	21 nt
			Mh-rev	718-CAT AAC GTT GGC GAC GTC TTT-738	MWG	21 nt
			Mh-Sonde*	691-AAT TTC ATG GTT TAG TTG ATC GTG AA-716	Eurogentec	26 nt
<i>M.hominis</i>	P80	Z29068	Mh IV-for	612-TGC TTT TTG AGG CAC AGC AA-631	MWG	20nt
			Mh IV-rev	653-TGC TAA CGC AAC GCC AAT TC-672	MWG	20nt
			Mh IV Sonde*	633-AGC AAC CGC AGT TGC TGC A-651	Biospring	19nt
<i>M.genitalium</i>	tuf-Gen	U39727	Mg-for	311-AAA CGT CAC TAT GCC CAT GTT G-332	MWG	22 nt
			Mg-rev	360-TGC AGC ACC TGT GAT CAT ATT TT-382	MWG	23 nt
			Mg-Sonde*	334-CTG TCC TGG ACA TGC TGA CTA CAT T-358	Eurogentec	25 nt
<i>Homo sapiens</i>	GAPDH	>gil30582624	GAPDH for	CCA CCC ATG GCA AAT TCC	MWG	18nt
			GAPDH rev	ATG GGA TTT CCA TTG ATG ACA AG	MWG	23nt
			GAPDH Sonde*	TGG CAC CGT CAA GGC TGA GAA CG	Eurogentec	23nt

* 5`FAM / 3`TAMRA – markiert

2.1.3 Master Mix

2 x Mastermix für TaqMan PCR Eurogentec

2 x Mastermix für Sybrgreen PCR Eurogentec

2.1.4 Enzyme

Proteinase K Sigma

Taq DNA Polymerase Invitrogen

Sph I (C↓GTACG) Amersham

Sal I (C↓AGCTG) Amersham

2.1.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Firma
DH5α	Gibco BRL

Bakterienart	Bezeichnung
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4780
<i>Haemophilus influenza</i>	ATCC 49247
<i>Haemophilus parainfluenza</i>	VE 396
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Serovare 2,4,5,7-13
<i>Ureaplasma parvum</i>	Serovare 1,3,6 und 14
<i>Mycoplasma arginini</i>	10129
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	10162
<i>Mycoplasma salivarium</i>	10113
<i>Mycoplasma primum</i>	10163
<i>Mycoplasma orale</i>	10112
<i>Mycoplasma fermentans</i>	10117
<i>Mycoplasma buccale</i>	10136
<i>Mycoplasma pirum</i>	25960
<i>Mycoplasma genitalium</i>	33530
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	15492
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	NC 10139
<i>Mycoplasma hominis</i>	FBG, PG 21, Klinische Isolate (2477, 1358, 9597, 2539, 21227, 10428, 2503, 10625, 506, 13932, 18891, 7835, 21127, 24280, 2750, 18571, 7447, 5278, 7506, 6148, 1014, 1636, 7317, 6234, 4518, 4441, 861, 4518, 1014, 7317, 1573, 5681, 1587, 7388, 8875, 10525, J1770, J1854, 20272, 20273, 12702, 10647)

2.1.6 Klonierungsvektor

Plasmid	Größe (kb)	Resistenzgene	Charakteristika	Firma
pGEM-T	3,0	Amp	LacZ'Gen, SP6- und T7 Promotor, fl-ori	Promega

2.1.7 Marker

	Größen in bp	Firma
	<p>bp</p> <p>12,216 11,198 10,180 9162 8144 7126 6108 5090 4072 3054 2036 1636 1018 506,517 396 344 298 220 201 154 134 75</p> <p>Hinf I fragments of the vector</p> <p>1 Kb DNA Ladder 0.5 µg/lane 0.9% agarose gel stained with ethidium bromide</p>	
1-kb-Leiter		Gibco BRL

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

2.2.1.1. Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

3 ml LB-Amp-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 100 µg/µl Ampicillin, pH 7,5) wurden mit einer Bakterienkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden 2 Minuten bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert. Nachdem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 300 µl Lösung 1 (50 mM Tris/HCL pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und mit 12 µl RNase1-Lösung (400 µg/ml) versetzt. Um die Zellen zu lysieren erfolgt die Zugabe von 300 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS). Nach Mischen des Ansatzes, der viskös und klar wird, wurden 300 µl Lösung 3 (2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8) hinzugegeben und kräftig geschüttelt, wobei weiße Flocken (chromosomale DNA und Proteine) ausfielen. Um die Plasmid-DNA vom Präzipitat zu trennen, wurde erneut bei 13000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 800µl des Plasmid-haltigen Überstandes abgenommen und mit 640 µl Isopropanol gemischt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Plasmid-DNA-Präzipitat in 500µl kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 rpm pelletiert. Die luftgetrocknete DNA wurde in 30µl 10mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung der Ausbeute an Plasmid DNA wurde die Konzentration im Spektralphotometer bei 260 nm gemessen (Kapitel 2.2.4.1).

2.2.2 Klonierung

2.2.2.1 Transformation kompetenter *E.coli* - Bakterien

Zu 200 µl kompetenten *E.coli*- DH5a wurde 1 µl der präparierten Plasmid-DNA-Lösung (ca. 100-200 ng DNA) hinzugegeben. Nach dem Mischen wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 2 Minuten bei 42°C im Wasserbad erhitzt, um danach wiederum für 1-2 Minuten auf Eis gestellt zu werden.

Zu dem Ansatz wurde dann 400 µl SOC-Medium (2 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,0, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose) pipettiert. Nach 1-stündiger Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurde dem Ansatz 5 ml LB-Amp-Medium (1% Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 100 µg/µl Ampicillin, pH 7,5) zugesetzt und die Bakterien über Nacht bei 37°C geschüttelt.

2.2.2.2 DNA-Restriktion

Zur Restriktion des in den pGEM T-Vektor klonierten GAPDH-Gens wurden 5 µl Plasmid-DNA, jeweils 4 µl Restriktionsenzyme *Sph* I und *Sal* I, 84 µl Wasser in 48 µl OPA- Puffer („One-Phor-All“) gegeben und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.

Zur Überprüfung der Restriktion wurde eine gelelektrophoretische Trennung der Fragmente auf 1,5 % - 3 % Agarosegelen durchgeführt.

2.2.3 Lagerung von Bakterien

Um Bakterienkulturen lagerungsfähig zu machen, wurden 800 µl einer Bakterienkultur in LB-Amp-Medium mit 200 µl Glycerin versetzt (Endkonzentration 20 %). Diese Kulturen waren dann bei -20°C gelagert mehrere Monate haltbar.

2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Analyse restringierter oder amplifizierter DNA wurden je nach Größe der DNA-Fragmente 1,5-3 %ige Agarosegele verwendet. Je kleiner das DNA-Fragment, desto höherprozentig sollte das Gel sein.

Als Laufpuffer diente 0,5 % TBE (90 mM Tris, 90 mM Borat, 0,5 mM EDTA, pH 8,0). Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 15 % Ficoll) versetzt und bei 50mA im Gel aufgetrennt. Als Längenstandard diente der 1-kb-DNA Marker (Gibco BRL).

Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel 10 Minuten in 0,1 %-iger Ethidiumbromidlösung inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen in Wasser wurde das Bandenmuster unter UV-Licht bei 302 nm fotografisch dokumentiert.

2.2.5 Konzentrationsbestimmungen

2.2.5.1 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Um den DNA-Gehalt einer Probe im Photometer bestimmen zu können, wurde in eine Quarzküvette zu 100µl Wasser 1µl der Probe gegeben. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung bei 260 nm absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Bei 260nm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von

50 µg DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml bzw. 33 µg Oligonukleotide/ml.

Da das Verhältnis von Protein zu DNA etwas über die Reinheit der Nukleinsäureprobe aussagt, wurde der gemessene Wert bei 260nm (Absorptionsmaximum von DNA) durch den bei 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) geteilt. Hierbei sollte das Ergebnis idealerweise zwischen 1,7 bis 2,1 liegen.

2.2.5.2 Keimzahlbestimmung von *E. coli*-Bakterien

Die Keimzahl einer Bakteriensuspension wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe bestimmt. Hierbei wurden mit einer sterilen Öse eine Bakterienkolonie von einer Platte genommen und in 500µl steriler NaCl-Lösung resuspendiert. Hiervon werden 50µl in 450µl NaCl gelöst, aus diesem Gemisch dann erneut 50µl in wiederum 450µl NaCl usw., sodass in jedem Gefäß eine Mischungsverhältnis von 1/10 vorlag. Aus den Verdünnungsstufen 10^{-1} – 10^{-12} wurden jeweils 100µl auf Kulturplatten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nach 1-2tägiger Inkubation wurde die Anzahl der Kolonien einer Platte ausgezählt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Ausgangskonzentration der Bakterienlösung zu bestimmen.

2.2.5.3 Bestimmung der Bakterienzahl mittels CCU

Eine gängige Methode, die Keimzahl einer Mycoplasmensuspension zu ermitteln, ist die Bestimmung der CCU (colour changing units). Hierzu wurden in eine sterile 96-Well-Platte pro Well 200µl des entsprechenden Flüssigkulturmediums pipettiert. In das erste Well der obersten 4 Reihen wurden 20µl der zu bestimmenden Bakterienkultur gegeben. Nach Resuspendieren mit dem vorliegenden Medium wurden aus diesem Well 20µl entnommen und in das nächste Well der Reihe pipettiert, dort ausreichend gemischt und anschließend 20µl in das darauf folgende überführt, sodass eine Verdünnungsreihe entsteht. Nach 5tägiger Inkubationszeit bei 37°C unter anaeroben Bedingungen wurde die Anzahl der sich in der Farbe veränderten Wells abgelesen. Mit der Annahme, dass in der höchsten Verdünnungsstufe die Einsaat eine einzelne Mycoplasmenzelle zu logarithmischem Wachstum und somit Farbumschlag des Mediums geführt hat, konnte unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe die Keimzahl der Mycoplasmenausgangskultur errechnet werden, die als CCU/ml angegeben wird.

2.2.6 Bakterienkultivierung

2.2.6.1 Herstellung von Flüssigkulturmedien

Zur Anzucht von *M. hominis* benötigt man Argininmedium, für *M. genitalium* Glukosemedium. Die Grundzusammensetzung beider Medien war identisch: 21g PPLO-Broth

wurde in 730 ml A.dest gelöst und anschließend autoklaviert. Danach wurden 100 ml Pferdeserum, 100 ml 10%iges Hefeextrakt und 10 ml sterilfiltriertes 0,2%iges Phenolrot hinzugefügt. Zum Kulturmedium für *M. hominis* wurde 50 ml sterilfiltrierte 20(w/v) %-ige Argininlösung und für *M. genitalium* 50 ml sterilfiltrierte 20 (w/v) %-ige Glukoselösung zugesetzt. Der pH-Wert des Argininmediums wurde mit 1 M HCl auf pH 6,5 - 6,6 eingestellt, das Glucosemedium wurde mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

Ureaplasmen lassen sich statt in einem PPLO-Broth-haltigen Medium besser in 17-BH-Medium anzüchten. Hierfür wurden 20 g TSB und 2 g Hefe in 800 ml A.dest gelöst und anschließend autoklaviert. Danach wurden 200 ml Salzlösung (50 g NaCl, 5 g MgCl₂, 119 g Hepes, 18 g Harnstoff, 1,3 g Natriumsulfit, 1g Na₂HPO₄ und 3,7 g KH₂PO₄ in 2000 ml A.dest gelöst und sterilfiltriert), 5 ml 0,2 %iges Phenolrot und 10 ml Pferdeserum hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl auf pH 6,0 – 6,5 eingestellt.

2.2.6.2 Kultivierung von Mycoplasmen und Ureaplasmen

Zur Anzucht der *Mollicutes* wurden drei sterile Anzuchtröhrchen benötigt, in die jeweils 5 ml des entsprechenden Kulturmediums pipettiert wurden. In das erste wurden nun 0,5 ml einer auf Eis aufgetauten, bei -70°C gelagerten Gefrierkultur der entsprechenden Spezies hinzugefügt und gemischt. Aus dieser Suspension wurden 0,5 ml in das nächste Röhrchen überführt, dort erneut gemischt und 0,5 ml in das dritte Röhrchen pipettiert. Nach festem Verschließen der Röhrchen wurden die drei Verdünnungsstufen solange bei 37°C bebrütet, bis der Farbumschlag des Mediums in einem der Röhrchen das logarithmische Wachstum der Mycoplasmenspezies anzeigte.

2.2.7 Varianten der DNA-Aufbereitung aus Mycoplasmen

2.2.7.1 DNA-Aufschluss I

1 ml einer Mycoplasmen- oder Ureaplasmenkultur wurde 15 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 500 µl PBS resuspendiert und anschließend erneut 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet in 100µl 10mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.7.2 DNA-Aufschluss II

Das Bakteriensediment aus 1 ml Kultur (siehe Kap. 2.2.7.1) wurde nach einmaligem Waschen in PBS in 100µl A.dest resuspendiert und 15 Minuten bei 95°C inkubiert, was die osmotische

Lyse der Zellen zur Folge hatte. Vor der Lagerung bei -20°C wurde zur Stabilisierung der DNA $1\mu\text{l}$ 1M Tris/HCl pH 7,5 zupipettiert.

2.2.7.3 DNA-Aufschluss III (Proteinase-K-Verdau)

(nach Konrad Sachse und Joachim Frey, 2002)

Das Bakteriensediment aus 1 ml Kultur wurde in $50\mu\text{l}$ Lysepuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,5, 0,05 % Tween 20) resuspendiert und $20\mu\text{l}$ Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch 15-minütiges Erhitzen bei 97°C inaktiviert. Nach Zentrifugation bei 15000 g für 5 Minuten konnte der DNA-haltige Überstand für die PCR verwendet werden. Die Lagerung der Probe erfolgte bei -20°C .

2.2.7.4 DNA-Aufschluss IV

Die Mycoplasmen-DNA wurde hier nach dem Tissue-Protokoll des QIAamp DNA-Mini-Kits der Firma Qiagen aufgereinigt.

2.2.8 Ureasenachweis

Das bei Ureaplasmen vorkommende Enzym Urease spaltet Harnstoff zu Ammoniak. Die resultierende Alkalisierung des Nährmediums wird durch den Farbwechsel des pH-Indikators Phenolrot angezeigt. Zum Nachweis der Ureaseaktivität anderer Bakterien wurden in sterilen Reagenzgläsern mit 5ml Testsubstrat (0,1 (w/v) % Pepton, 0,5 (w/v) % NaCl, 0,1 (w/v) % Glukose, 0,2 (w/v) % KH_2PO_4 , 0,00012(w/v) % ml Phenolrot, 100ml einer 20%igen Harnstofflösung, pH 6,8-6,9) Bakterien, die zur Harnstoffspaltung fähig sein sollten, hinzugefügt. Der Ansatz wurde bei 37°C 24-48 Stunden bebrütet. Wurde in dieser Zeit ein Farbumschlag beobachtet, so lag ein positiver Ureasenachweis vor.

2.2.9 Polymerasekettenreaktion

2.2.9.1 Real Time PCR

Für die Real Time PCR wurden die Geräte Gene Amp der Firma Roche und der iCycler der Firma BioRad verwendet.

Der PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen :

Template	2,5 μl DNA-Lösung (siehe Kap. 2.2.)
Primer	je 2,5 μl (3 μM)
Sonde	2,5 μl (2 μM)

2 x Mastermix (inkl. NTPs, Puffer; TaqPolymerase)	12,5 µl
A.dest	2,5 µl

Bis auf das Template wurden alle Bestandteile des PCR-Ansatzes in dem MasterMix Raum zusammengegeben und in die 96 Well Platte pipettiert. Die Zugabe des Templates erfolgte in einem anderen Raum. Die PCR wurde anschließend wie folgt durchgeführt:

Zyklus	Schritt	Temperatur	Zeit
1	1	50°C	10 Minuten
2	1	95°C	10 Minuten
3-47	1	95°C	15 Sekunden
	2	60°C	1 Minute

Von einer vorhergehenden PCR eingeschleppte Amplifikate würden im 1. Zyklus bei 50°C durch die enthaltene Amperase zerstört, da in die synthetisierten Amplikons Uridin statt Thymidin eingebaut wird.

2.2.9.2 Konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR wurde das PCR-Gerät T-Gradient der Firma Whatman Biometra benutzt.

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Template	0,5 µl DNA-Lösung (siehe Kap. 2.2.)
Puffer	5 µl 10fach PE-Puffer (+ 15 mM MgCl ₂)
Desoxyribonukleosidtriphosphate	8µl NTP-Mix (je 1,3 mM GTP, CTP, ATP, TTP)
Primer	je 0,5µl Primer (0,1 mM)
A. dest	34,5 µl
Taq DNA Polymerase	1µl Taq Polymerase (5 Units/µl)

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit
1. Erhitzen	95°C	5 Minuten
2. Denaturierung (Trennung der DNA-Stränge)	95°C	1 Minute
3. Annealing (Hybridisierung der Primer an ihr Template)	52°C	1 Minute
4.Elongation	72°C	1 Minute

Die Schritte 2 bis 4 wurden 40 mal zyklisch wiederholt.

Zur Analyse wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.4).

2.2.10 Sequenzierung

Die Überprüfung der klonierten Amplikons erfolgte im BMFZ (Biologisch-Medizinisches-Forschungszentrum) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Sequenzierung nach Sanger auf einer ABI 373A-Maschine.

2.2.11 Verwendete Analyseprogramme

Lasergene

Software der Firma DNASTAR

Blast

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

3. Ergebnisse

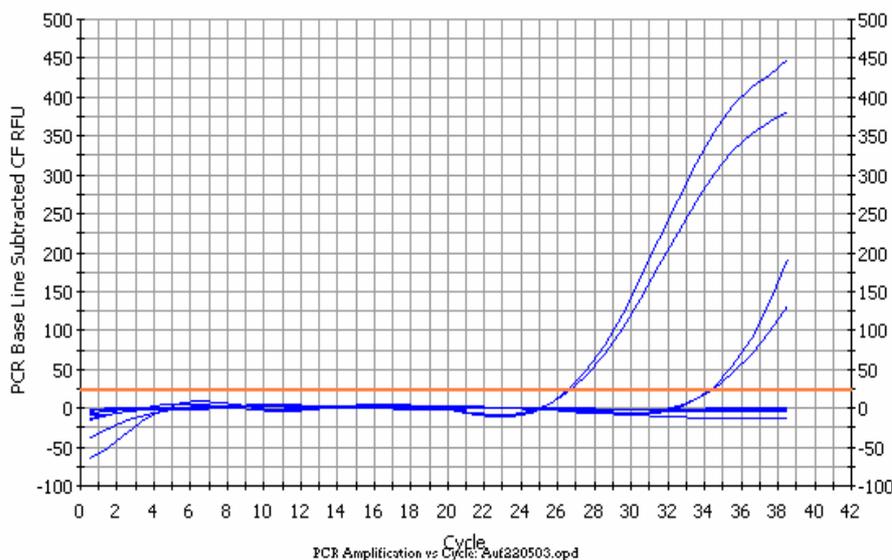
3.1 RealTime PCR als Alternative zur kulturellen Diagnostik

Um die Diagnostik urogenital relevanter Krankheitskeime zu vereinfachen, war das Ziel dieser Arbeit, eine RealTime PCR zu etablieren. *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* und *U. parvum* sind (fakultativ) humanpathogene Erreger, die überwiegend den Urogenitaltrakt besiedeln und Krankheiten wie z.B. Urethritis (5, 18, 21, 30, 36, 43, 44), Adnexitis (5, 30, 43) oder unspezifische Genitalinfektionen (5, 21, 42) hervorrufen und zum Teil auch zu einem vorzeitigen Schwangerschaftsende (12, 22) führen können. Die herkömmliche Diagnostik dieser zellwandlosen Bakterien beschränkte sich bis vor kurzem auf die kulturellen Anzucht. Bei Kultivierung in supplementiertem PPLO-Medium (1, 5) verstoffwechseln Ureaplasmen Harnstoff, *M. hominis* Arginin und *M. genitalium* Glucose. Der durch die Stoffwechselprodukte bedingte Farbumschlag des jeweiligen Mediums, der je nach Keimeinsaat und Spezies erst nach mehreren Tagen eintritt, zeigt den positiven Nachweis der entsprechenden Bakterienspezies an, wenn das Kulturmedium keine Trübung aufweist.

Die Diagnostik mittels kultureller Anzucht beinhaltet jedoch auch Schwierigkeiten. So ist es beispielsweise wichtig, die Kontamination des Kulturmediums mit anderen humanbesiedelnden Bakterien auszuschließen (was durch o.g. Trübung des Mediums angezeigt wird), da diese zu falschen Ergebnissen führen könnte. Ein zeitaufwändiges Sterilfiltrieren der Probe bringt hier Abhilfe, da nur die zellwandlosen Bakterien 0,2 µm Filter passieren können. Als alternative Diagnostikmöglichkeit sollte eine RealTime PCR etabliert werden. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem *in vitro* hochsensitiv spezifische Nukleinsäureabschnitte nachgewiesen werden. Es erfolgt bei der PCR eine zyklische DNA-Neusynthese der Zielsequenzen mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), eines die Zielsequenz einrahmenden Primerpaars und der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen. Um eine Bindung der Primer zu ermöglichen, erfolgt als erster Schritt eine Trennung der in der Probe vorhandenen Nukleinsäure-Doppelstränge in Einzelstränge durch thermische Denaturierung. Anschließendes Abkühlen des Ansatzes erlaubt eine Anlagerung der Primer und die nachfolgende Synthese des zweiten DNA-Stranges. Die Abfolge dieser zwei Schritte wird in der PCR zyklisch wiederholt (40-fach), wobei bei jedem PCR-Zyklus im Idealfall eine Verdopplung der Zielsequenz erfolgt. Da die Syntheseprodukte ihrerseits als Zielsequenz nachfolgender Synthesen dienen, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung dieser. Durch Einsatz eines bei Interkalation in den DNA-

Doppelstrang fluoreszierenden Farbstoffes wird durch Messung der Fluoreszenzänderung eine Analyse entstehender Amplikons in Echtzeit ermöglicht. Hierbei wird vom Computerprogramm des verwendeten PCR-Gerätes (iCycler IQ der Firma BIO RAD) im Bereich der linearen Änderung mittels einer Geraden (Tresh Hold) auf der Kurve ein Punkt markiert (siehe Abb.3.1). Um eine Aussage über die DNA-Menge, die in der Probe enthalten ist, zu bekommen, wird ein Plasmid eingesetzt, das die zu amplifizierende Sequenz enthält. Da die DNA-Menge des Plasmids bekannt ist, kann anhand der Fluoreszenzmessung die DNA-Menge der unbekannt Probe errechnet werden. Hierbei werden die Schnittpunkte des Tresh Holds mit der Kurve von der unbekannt Probe mit dem der Plasmid-Kurve ins Verhältnis gesetzt.

Abbildung 3.1 zeigt eine Verdünnungsreihe eines *M. hominis* – Plasmids (Standard) in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Kopien bzw. $2,5 \times 10^3$ Kopien.



Konzentration des <i>M. hominis</i> Standards (Kopien/25µl PCR-Ansatz)	Threshold
$2,5 \times 10^5$	26,55
$2,5 \times 10^5$	26,70
$2,5 \times 10^3$	34,28
$2,5 \times 10^3$	34,37

Abb. 3.1: Messung der Fluoreszenzstärkenänderung im linearen Bereich der Kurve anhand einer Verdünnungsreihe eines *M. hominis* - Plasmids

Für die Anwendung der Realtime-PCR in der Diagnostik muss der Nachweis erbracht werden, dass der amplifizierte Bereich zwischen den Primern ebenfalls der Sequenz des nachzuweisenden Genabschnittes dieser Spezies entspricht. Die hier zu etablierende RealTime PCR sollte mittels 5'-Nuklease Assay (Taqman PCR) durchgeführt werden. Hierbei wird ein Oligodesoxyribonukleotid als Sonde eingesetzt, das an den Bereich, der von den Primerpaaren flankiert wird, bindet (Abb. 3.2). Die Sonde trägt an ihren Enden zwei Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlicher Anregungs- und Emmissionswellenlängen. Im ungebundenen Zustand der Sonde in Lösung und zu Beginn jedes Zyklus an die Zielsequenz hybridisiert unterdrückt der 3'-Farbstoff Q (Quencher) die Fluoreszenz des 5'-Reporters (F). Mit fortschreitender Elongation der DNA-Synthese trifft die Taq-Polymerase auf die gebundene Sonde und spaltet mit Hilfe ihrer 5'-Nukleaseaktivität den Reporter ab. Da der Quencher nun nicht mehr in räumlicher Nähe ist, um die freiwerdende Energie des Reporters abzufangen, kann die Fluoreszenz des Reporters nun gemessen werden.

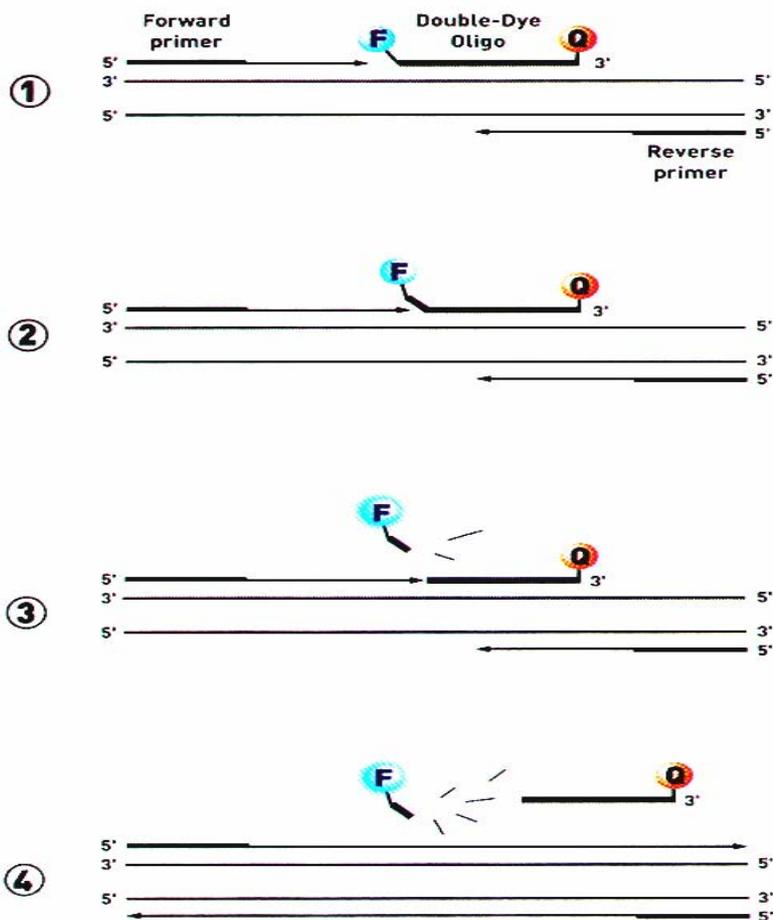


Abb. 3.2: Prinzip der Taqman PCR:

1. Sonde bindet an DNA; 2. Quencher unterdrückt die Fluoreszenz des Reporters
3. Während der Elongation wird mit Hilfe der 5'-Nukleaseaktivität der TaqPolymerase der Reporter abgespalten; 4. Fluoreszenz kann gemessen werden, wobei diese direkt proportional zur DNA-Menge ist

Da jeder Zyklus gerade mal 1,25 Minuten dauert, kann ein Ergebnis mittels RealTime PCR in wenigen Stunden vorliegen. Ein Vorteil dieser Methode liegt somit in der wesentlichen Zeitersparnis gegenüber dem kulturellen Nachweis, der mehrere Tage dauert. Des Weiteren reicht die Anzahl der sich in dem Abstrichmaterial befindenden Keime für einen direkten Nachweis nicht aus, sodass die RealTime PCR eine Alternative zur Kultivierung darstellt, um kleinere Keimzahlen nachweisen zu können. Der größte Vorteil dieser Methode liegt jedoch, wie oben bereits erwähnt, in der Möglichkeit der Quantifizierung nachgewiesener Genomäquivalente und somit der exakten Bestimmung der Keimzahl des Bakteriums in einer

Patientenprobe, was speziell bei fakultativ-pathogenen Keimen wie *Ureaplasma* und *M. hominis* entscheidend für die ätiologische Bedeutung ihres Nachweises sein kann.

In Vorarbeiten der Mycoplasmenarbeitsgruppe des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der HHU Düsseldorf war eine Nested PCR entwickelt worden, um sieben Urethritis-relevante Krankheitskeime nachzuweisen. Das Konzept, alle sieben Erreger zeitgleich in einer Amplifizierungsreaktion zu erfassen, setzte voraus, dass sieben Primerpaare im Ansatz der ersten PCR als auch der „genesteten PCR“ vorhanden sein mussten. Dies erwies sich bei Amplifikation von mehr als einer Spezies-DNA als problematisch, weil die verschiedenen DNAs zu gegenseitigen Hybridbildungen zu neigen schienen und sich dies inhibitorisch auf die Amplifikationen auswirkten (16).

Dem Gedanken folgend, unter identischen PCR-Bedingungen verschiedene Keime nachzuweisen, sollte eine RealTime PCR etabliert werden, die den Vorteil bietet, simultan 96 Amplifikationsreaktionen durchführen und computergestützt quantifizieren zu können. Eine kontaminationsträchtige gelelektrophoretische Nach-Analyse der PCR-Produkte würde somit überflüssig. Mit der Verwendung von Mikrotiterplatten, in denen die Patientenproben unter gleichen Reaktionsbedingungen simultan den verschiedenen PCRs unterzogen werden können, sollte sich das Problem der Kontamination als auch der Inhibierung der DNA-Neusynthese durch zuviel Primerpaare vermeiden lassen.

3.2 Das humane GAPDH-Gen als Positivkontrolle

Bevor sich dem Primerdesign für den spezifischen Nachweis der einzelnen Bakterien gewidmet werden konnte, wurde an der Entwicklung einer Positivkontrolle gearbeitet. Diese Kontrolle sollte die Aufgabe erfüllen, menschliches Genmaterial aus den vorwiegend zu analysierenden Urethral- und Cervikalabstrichen in einem PCR-Ansatz nachzuweisen und somit eine Inhibition der PCR auszuschließen. Hierzu wurde die Gensequenz eines Proteins gesucht, welches in der humanen Zelle vorkommt.

Die Wahl fiel hier auf das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), was in der Glycolyse und Gluconeogenese die Umwandlung von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Diphospho-D-glycerat katalysiert. Würde das humane GAPDH-Gen in einer Patientenprobe nicht detektiert, wäre entweder die Güte des Abstrichs nicht ausreichend für einen Erregernachweis oder Inhibitoren (wie sie in blutigen Proben vorkommen) der PCR enthalten.

Mittels des Computerprogramms „Primer Express“ (Applied Biosystems) konnten innerhalb des humanen GAPDH-Gens geeignete Primer- und Sondenbindungsstellen ermittelt werden. Kapitel 2.1.2 zeigt die Sequenzen der Primer bzw. der Taqman-Sonde.

Zuerst blieb nun zu klären, ob das GAPDH-Gen urogenital-vorkommender Bakterien so homolog zum humanen GAPDH-Gen ist, dass eine Amplifizierung bakterieller Sequenzen möglich wäre. Um sicherzustellen, dass die GAPDH-Primer nicht an Bakterien-DNA binden, wurden diese an DNA von fakultativ human-pathogenen Bakterien des Urogenitaltrakts getestet. *M. hominis* wurde aus einer Gefrierkultur im Argininmedium, die Ureaplasmen in 17-BH-Harnstoffmedium angezüchtet (siehe Kapitel 2.1). Bei *E. coli* wurde das K12-Derivat DH5 α , bei *C. trachomatis* ein Isolat aus dem Diagnostiklabor des Instituts als Template verwendet. Zum Nachweis, dass diese Proben amplifizierbare DNA enthielten, wurden sie (bis auf *E. coli*) mittels der jeweiligen *M. hominis*-, *U. urealyticum*-, *U. parvum*- bzw. *C. trachomatis*-Primer amplifiziert (siehe Kapitel 3.3).

Wie man in Abbildung 3.3 deutlich sieht, amplifizierten die GAPDH-Primer keine Bakterien-DNA. Das Vorhandensein amplifizierbarer DNA von *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* und *C. trachomatis* wurde mittels der jeweiligen Spezies-spezifischen PCR nachgewiesen (siehe Kap. 3.3)

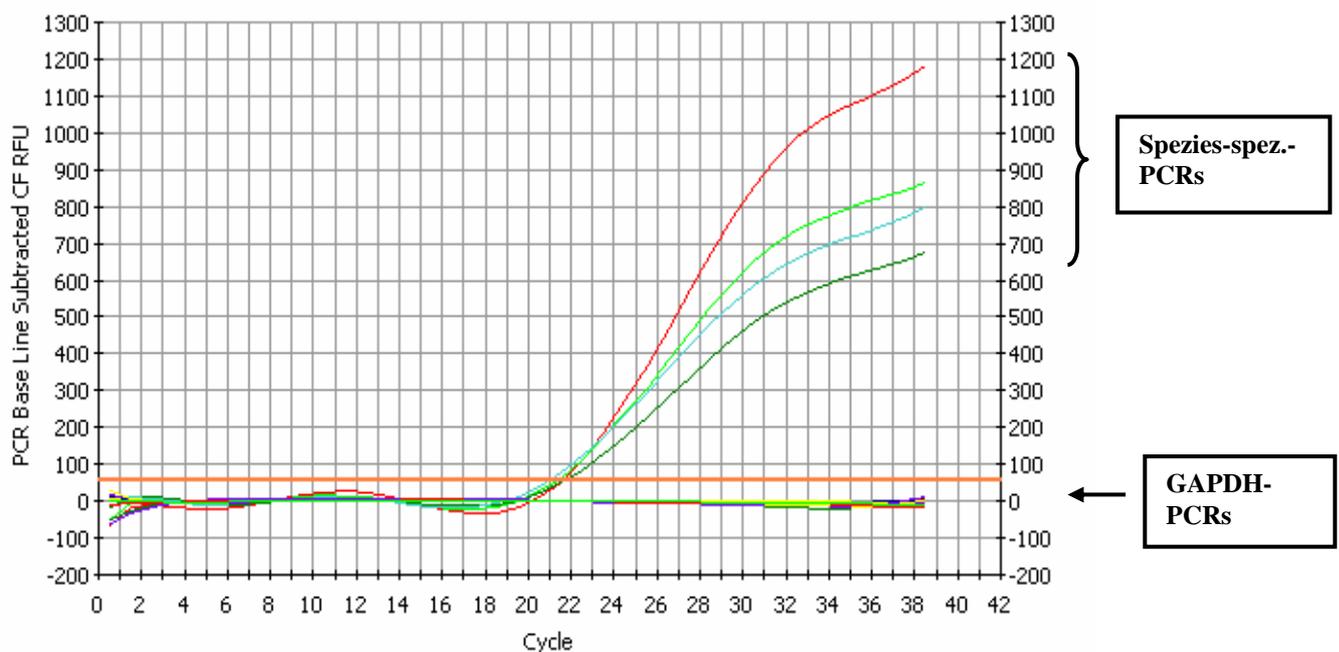


Abb. 3.3: Spezifität der TaqMan zum Nachweis humaner GAPDH

3.3 Design der TaqMan PCRs zum Nachweis urogenital-relevanter Keime

Unter Zuhilfenahme des Computerprogramms „Primer Express“ (Applied Biosystems) wurden anschließend geeignete Primer für die Ureaplasmen-Spezies *U. urealyticum* und *U. parvum* sowie für *M. genitalium* und *M. hominis* ermittelt. Hierbei wurden bei Eingabe einer möglichst spezies-spezifischen Gensequenz von dem Softwareprogramm „Primer Express“ Primer und Sonde vorgeschlagen, die bei einer konstanten Annealingtemperatur von 60°C optimal binden und keine Sekundärstrukturen wie intra- oder intermolekulare Haarnadelstrukturen („Hairpinloops“) aufweisen. Die Primersequenzen waren in der Regel 15-30 Nukleotide lang, um eine ausreichende Spezifität gewährleisten zu können. Gemäß den Vorgaben des Programmes wurden keine Primer mit vier aufeinander folgenden gleichen Basen vorgeschlagen, da dies Leserahmenverschiebungen begünstigt hätten. Die Güte der gefundenen Primerpaare lies sich aus dem jeweiligen Score (Penalty) ableiten, der nach Möglichkeit einen Wert unter 100 haben sollte.

Da bis zum Beginn der experimentellen Arbeiten nur die Genome von *M. genitalium* und *M. pneumoniae* komplett entschlüsselt waren, war die Auswahl der möglichen Zielsequenzen für den Nachweis von *M. hominis* bzw. beide Ureaplasmenpezies auf die bereits bekannten Gene beschränkt.

Wie eingangs erwähnt, wurden Ureaplasmen bis 1998 in 2 Biovare eingeteilt. Biovar 1 entspricht nun der Spezies *Ureaplasma parvum*, bestehend aus den Serovaren 1, 3, 6 und 14 und Biovar 2 *Ureaplasma urealyticum*, das sich aus den Serovaren 2, 4, 5 und 7-13 zusammensetzt. Ureaplasmen sind mit Hilfe des Enzyms Urease in der Lage, Harnstoff zu spalten. Da sich die Ureasegene bereits als geeignet für den molekularbiologischen Nachweis von Ureaplasmen erwiesen hatten (Povlsen et al, 1998; Robertson et al., 2001), sollten sie zur Detektion von Ureaplasmen in der RealTime PCR benutzt werden.

Die Urease besteht aus den Untereinheiten A und B. Innerhalb der Gensequenz für die Ureasedomäne B wurde von „Primer Express“ unter Berücksichtigung der oben genannten Bedingungen geeignete Primer- bzw. Sondensequenzen mit Penalty-Werten von 123 (*U.urealyticum*) und 130 (*U. parvum*) ermittelt.

In einem Vergleich der zu amplifizierenden Genregionen mit den Sequenzen der EMBL-Datenbank wurde anschließend ermittelt, in welchem Maße die Primer an andere, homologe Bakteriengene binden könnten.

So war es zum einen entscheidend, welche anderen Spezies Homologien aufwiesen, denn nahezu identische Gensequenzen bei einem humanbesiedelnden Erreger wären weitaus

kritischer zu bewerten als die eines Bakteriums, das beispielsweise nur Mäuse besiedelt. Zum anderen musste auf den Grad der Homologie geachtet werden, da mit größer werdender Anzahl von Punktmutationen, speziell im 3'-Bereich der Primerbindungsstellen, eine Fehlamplifizierung unwahrscheinlicher wird.

Bei diesem Datenbankabgleich ergab sich für die ausgewählten Primer und SONDENSEQUENZEN der *U.parvum* PCR eine Homologie von 100 % für die Serovare 1, 3, 6 und 14 (*U. parvum*), und für die Serovare 2, 4, 5 und 7-13 eine nur 94,5 %ige Übereinstimmung, sodass für den Nachweis von *U. urealyticum* modifizierte Primer- und Sonden ausgewählt wurden, die unter gleichen Reaktionsbedingungen einen speziesspezifischen Bereich des Urease B Gens zu amplifizieren vermochten.

Durch Sequenzvergleich der Bindungsstellen der Primer in allen Serovaren zeigte sich letztendlich, dass das ausgewählte Primerpaar für *Ureaplasma parvum* aufgrund von drei Nukleotidaustauschen schlechter bzw. gar nicht an die Serovare 2, 4, 5 und 7-13 der Spezies *U. urealyticum* binden sollte. Bei dem Primerpaar für *Ureaplasma urealyticum* waren es vier Nukleotide, die nicht mit der Sequenz in den Serovaren 1,3,6 und 14 (*U.parvum*) übereinstimmten. Bei beiden Sonden zeigte sich jeweils ein Nukleotidaustausch, was zumindest theoretisch dazu führen sollte, dass auch die Sonden Speziesspezifisch binden. Die höchste Homologie zu anderen humanbesiedelnden Bakterien wurde für *Staphylococcus aureus* gefunden, wobei nur 65 des 74 nt Amplikons identischen waren, was durchaus toleriert werden konnte, da durch die Reaktionsbedingungen hier keine Fehlamplifikation zu befürchten war.

Als Template für den *M.genitalium*-Nachweis wurde das *tuf*-Gen ausgewählt, da frühere Untersuchungen der Mycoplasmenarbeitsgruppe dargelegt hatten, dass dieses „House keeping“-Gen trotz hoher Homologie zu anderen Spezies auch Spezies-spezifische Bereiche aufweist. Der EMBL-Datenbankabgleich ergab eine Übereinstimmung der zu amplifizierenden Genregion mit dem *tuf*-Gen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* von 88,8% (72/ 74 identische Nukleotide) und dem von *Staphylococcus aureus subsp.* von 87,3% (71/74 identische Nukleotide), um nur die beiden höchsten Werte zu nennen. Da *Chlamydomonas reinhardtii* kein humanbesiedelndes Bakterium ist und die drei Punktmutationen bei *Staphylococcus aureus* auf eine geringe Kreuzreaktivität mit den *M. genitalium*-Primern schließen ließ, wurden diese synthetisiert (Firma MWG).

Für den *M. hominis*-Nachweis entschieden wir uns anfänglich für das Lysyl-t-RNA-Synthetase-Gen. Auch hier erwies sich die Primersequenz theoretisch als geeignet, da die höchste Übereinstimmung mit einem humanbesiedelnden Bakterium bei 75,3 % (*S. epidermidis*) lag.

In Kapitel 2.1.2 sind die Primer- und SONDENSEQUENZEN für die oben erwähnten Erreger dargestellt.

3.4 Die Quantifizierung der PCR

Um eine quantitative Aussage über die in der RealTime PCR nachgewiesene Bakterien-DNA treffen zu können, wurde eine in der Kopienzahl standardisierte Probe des nachzuweisenden DNA-Abschnitts benötigt. Um diese herzustellen, wurden die Spezies-spezifischen Amplifikate in den Vektor pGEM-T kloniert und *E.coli*-DH5 α mit dem resultierenden Plasmid transformiert.

Wie in Abb. 3.4 zu sehen, verfügt der pGEM-T-Vektor über eine Klonierungsstelle zur Insertion PCR-generierter Fragmente, da konventionelle TaqPolymerasen an die 3'-Enden der Amplikons ein Adenyl anhängen.

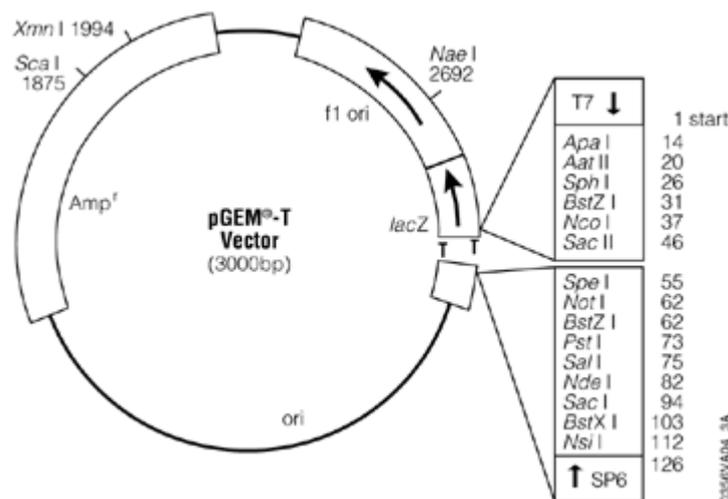


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des pGEM-T-Vektor

Zu beiden Seiten der Einklonierungsstelle schneiden die Restriktionsendonukleasen Sph I und Sal I das einklonierte Insert heraus. Die Pfeile in Abbildung 3.5 symbolisieren diese Schnittstellen.

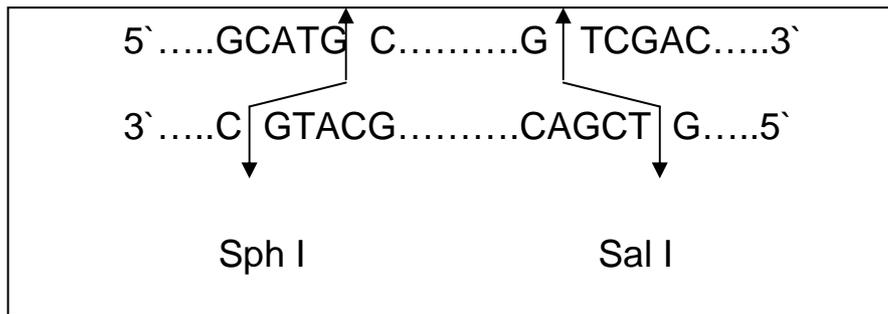


Abb. 3.5 Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen

Nach Transformation kompetenter *E. coli* DH5 α , Klonierung und Anzucht einzelner plasmidtragender *E.coli*-Bakterien wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt (siehe Kapitel 2), mittels SphI / SalI restringiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Abb. 3.6) die Insertgröße bestimmt. Die DNA der Klone, die die zu erwartende Insertgröße des Amplikons von 100 bp zeigten, wurde anschließend sequenziert.

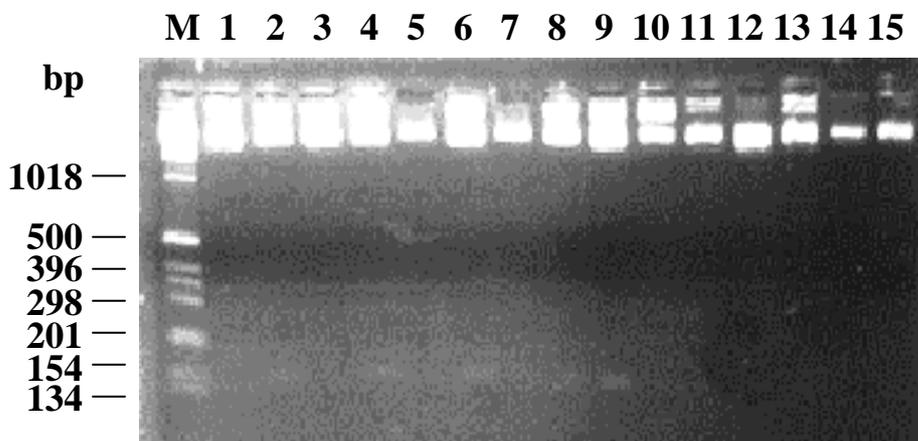


Abb.3.6: Gelelektrophoretische Auftrennung der SphI/SalI restringierten Plasmid DNA einzelner pGEMT-GAPDH-Klone

Durch anschließende Sequenzierung des Inserts einzelner GAPDH-Klone konnten spontan entstandene Punktmutationen aufgespürt werden, die im schlimmsten Fall dazu hätten führen können, dass die Primer nicht mehr an die DNA binden. Solche Plasmide wurden nicht zur Standardisierung der PCR benutzt.

Die Konzentration der präparierten Plasmid-DNA des sequenzierten GAPDH-Klons wurde anschließend photometrisch bestimmt. Da 1 OD bei 260nm 50µg DNA/ml entspricht und 1 µg Plasmid-DNA $2,97 \times 10^{11}$ Moleküle enthält, konnte die Molekülanzahl in den einzelnen Plasmidpräparationen errechnet werden. Anschließend wurden Verdünnungen erzeugt, die 10^5 , 10^3 , bzw. 10 Kopien des jeweiligen Plasmids pro µl enthielten und als Standards in die PCR eingesetzt, um die Kopienzahl des jeweilig nachzuweisenden Bakteriums in der unbekanntem Patientenprobe errechnen zu können (siehe Kapitel 3.1).

3.5 Evaluation verschiedener Probenaufschlussverfahren

Bei Verdacht auf eine Ureaplasmen- bzw. Mycoplasmeninfektion wurden den Patienten von der Urethra und (bei Frauen) von der Zervixoberfläche Abstriche entnommen, wobei der Abstrichtupfer in einem speziell für Chlamydien und Mycoplasmen entwickelten M4-Transportmedium (Firma Virotech) ins Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene transportiert wurde. Um das Abstrichmaterial für eine PCR adäquat aufarbeiten zu können, wurden mehrere Methoden parallel getestet. Da schon bei Vorversuchen die geringe Stabilität der Mycoplasmen- bzw. Ureaplasmen-DNA auffiel, sollte Gegenstand dieser Untersuchung vor allem die Stabilität der DNA sein.

Bei einem dieser Vorversuche wurden *M. hominis*-Isolate in Argininmedium kultiviert. Direkt nach der Aufarbeitung aus dem Argininmedium (siehe Kapitel 2.1) wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Nach der Messung wurden die Proben bei -20°C gelagert, nach 24 Stunden aufgetaut und erneut vermessen. In Abbildung 3.7 wird deutlich, dass nach 24-stündiger Lagerung bei -20°C die Menge der Bakterien-DNA in allen Proben abgenommen hat.

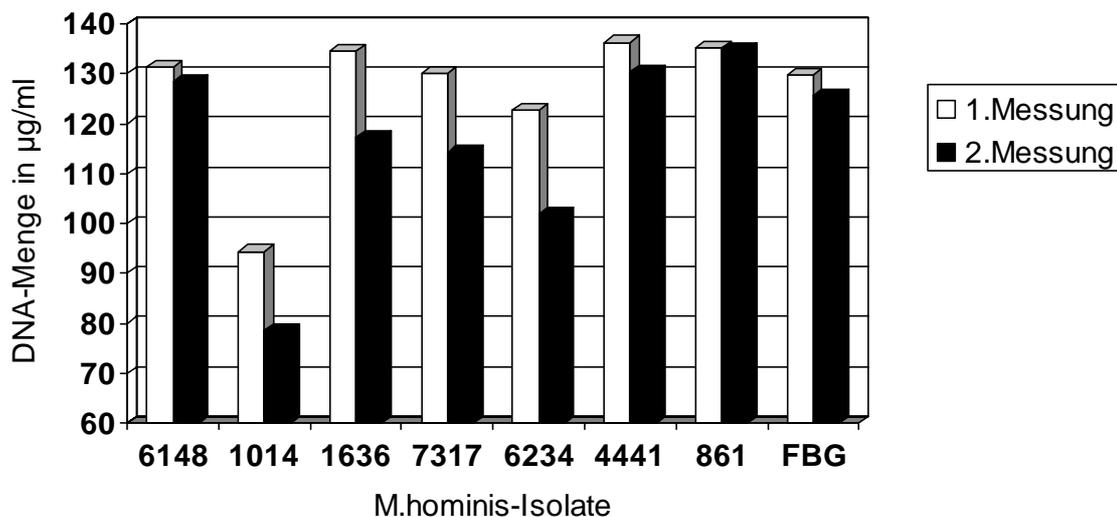


Abb. 3.7: Photometrische Bestimmung des Stabilitätsverlustes der Mycoplasmen-DNA

Aus dem oben beschriebenen Vorversuch ergab sich die Frage, welche Auswirkung der Verlust an Mycoplasmen-DNA auf den Nachweis in der RealTime PCR hat. Hierzu wurden zwei *M. hominis*-Stämme neu angezüchtet, aufgearbeitet, sofort in der RealTime PCR getestet und nach 7- bzw. 21-tägiger Lagerung bei -20°C erneut in die RealTime PCR eingesetzt. In Abbildung 3.7 kann man anhand der abnehmenden Kopienzahlen einen erheblichen DNA-Verlust im Laufe der Zeit erkennen.

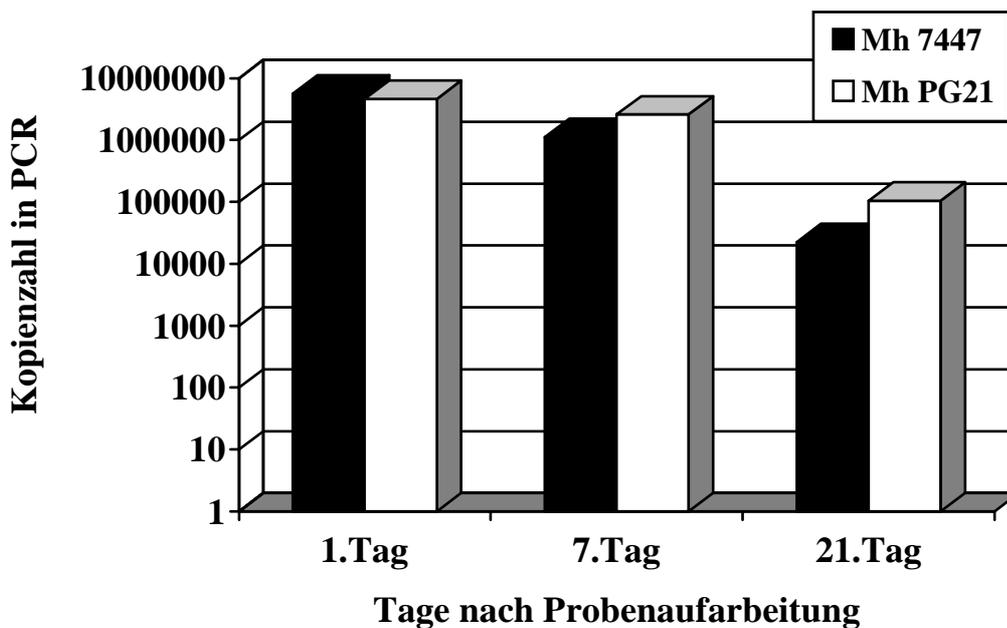


Abb. 3.8: Stabilitätsverlust der Mycoplasmen DNA in der RealTime PCR

Nach diesen Ergebnissen galt es nun, eine Methode zu finden, möglichst stabiles DNA-Material von dem Abstrich zu gewinnen und zugleich andere, die Analyse störende Partikel zum größten Teil zu eliminieren. Bevor jedoch Patientenmaterial aufgearbeitet wurde, sollten in einem Vorversuch zuerst erneut Bakterienreinkulturen untersucht werden, da diese in ihrer Probenzusammensetzung definiert waren und in unbegrenzter Anzahl kultiviert werden konnten. Am Tag der Aufarbeitung wurden sich im logarithmischen Wachstum befindlichen Kultur von *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis* und *M. genitalium* jeweils vier verschiedenen Aufarbeitungsmethoden unterzogen: die sedimentierten Keime wurden entweder in 10mM Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert (grüne Balken), osmotisch lysiert und dann auf 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 justiert (blaue Balken), einem ProteinaseK-Aufschluß unterzogen (hellblaue Balken) oder die DNA nach Qiagen präpariert (graue Balken) (siehe Kapitel 2.2.7). Jede Probe wurde anschließend in jeweils drei Portionen aliquotiert bei -20°C gelagert. Mit Aliquot 1 wurde am gleichen Tag eine RealTime PCR durchgeführt, der Rest

dieses Aliquots anschließend wieder bei -20°C gelagert. 7 Tage später wurden die Aliquots 1 und 2 in eine PCR eingesetzt, so dass beide Proben 7 Tage alt waren, Aliquot 1 im Gegensatz zu Aliquot 2 jedoch schon einmal aufgetaut worden war. Weitere 14 Tage später wurde Aliquot 3 versus Aliquot 1 getestet. So sollte sich die Frage beantworten lassen, inwieweit sich die Stabilität der DNA nach Aufarbeitung durch zwischenzeitiges Auftauen als auch längere Lagerung bei -20°C im Laufe der Zeit verändert.

Wie Abb. 3.9 zeigt, lieferte die Proteinase-K-Behandlung für *Ureaplasma spp.* und *M. hominis* die besten Resultate, d.h. die DNA war in allen Fällen gleich stabil und wies im Vergleich zu den anderen Aufarbeitungsmethoden (siehe Kapitel 2.2.7) das meiste DNA-Material auf, sodass schon bei geringerer PCR-Zyklenzahl der Threshold erreicht wurde. Abb. 3.9 lässt für *M. genitalium* die Verwendung von 10mM Tris/HCl pH 7,5 als beständigste Aufarbeitung erkennen.

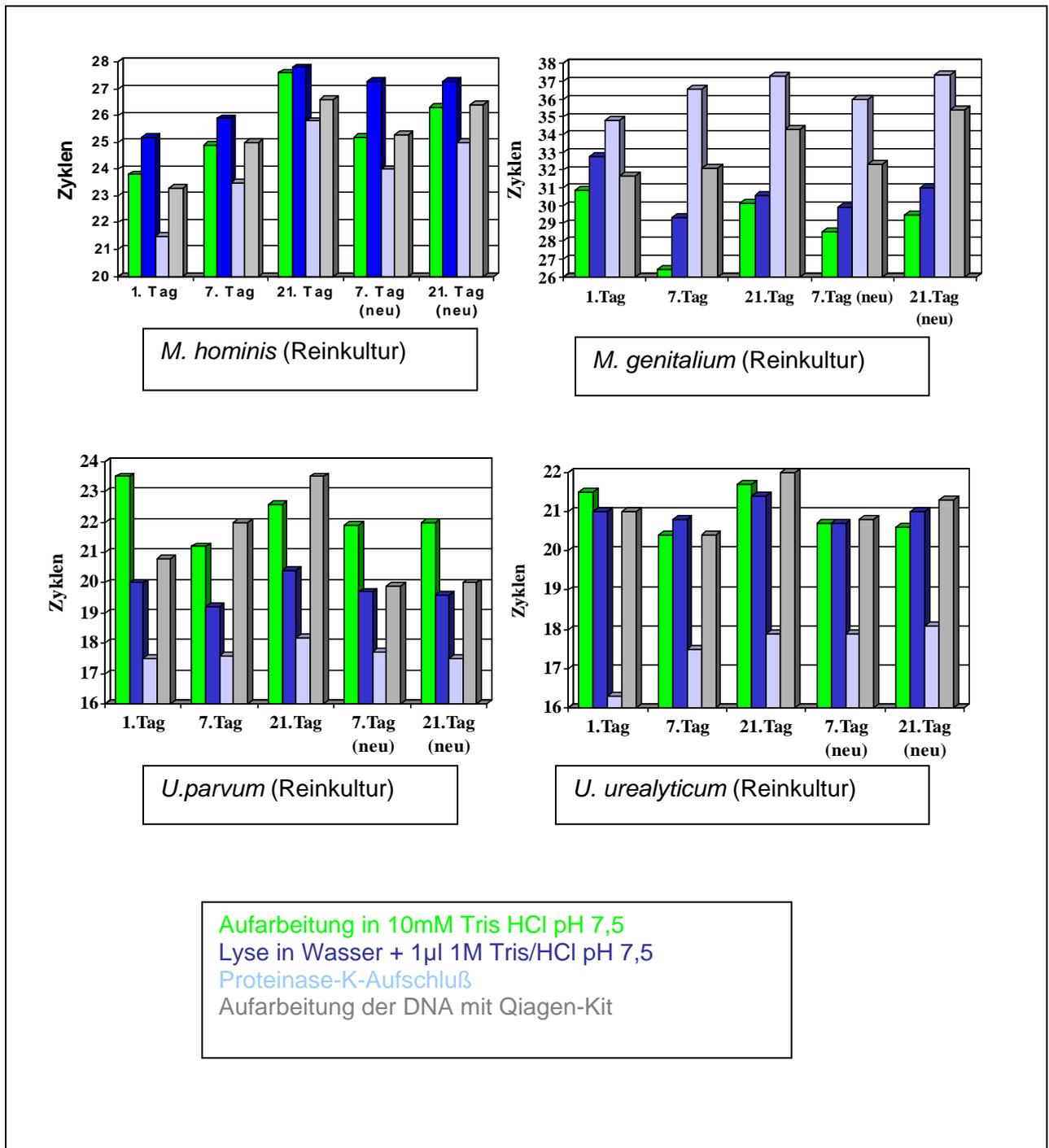


Abb. 3.9: Vergleich vier verschiedener Aufarbeitungsmethoden von Bakterienreinkulturen

Anschließend wurde eine analoge Versuchsreihe mit Patientenabstrichmaterialien durchgeführt, da Bestandteile der Abstriche eventuell zu unterschiedlichen Ergebnissen bei den verschiedenen Aufbereitungsverfahren führen könnten. Wiederum frisch angezüchtete Bakterienstämme der Ureaplasmen und Mycoplasmen wurden zentrifugiert, das jeweilige Bakteriensediment in 500µl PBS gewaschen und schlussendlich in 100 µl PBS resuspendiert.

Hiervon wurden 50 µl zu 1 ml Abstrichmaterial in M4-Transportmedium gegeben. Bei dem Abstrichmaterial handelte es sich um gepoolte Proben verschiedener Patienten, die nachweislich Ureaplasmen und Mycoplasmen negativ waren, wobei eine Probe nur Zervikal- die andere nur Urethralabstriche enthielt. Die Aufarbeitung und Portionierung der Proben, sowie der zeitliche Einsatz in die RealTime PCR wurde wie für die Reinkulturen beschrieben durchgeführt.

Bei den zervikalen Proben lieferte die Proteinase-K-Behandlung bei allen vier Erregern die besten Ergebnisse und dies sowohl im Hinblick auf die Haltbarkeit über die Zeit als auch auf die Menge der aufgeschlossenen DNA (Abb. 3.10).

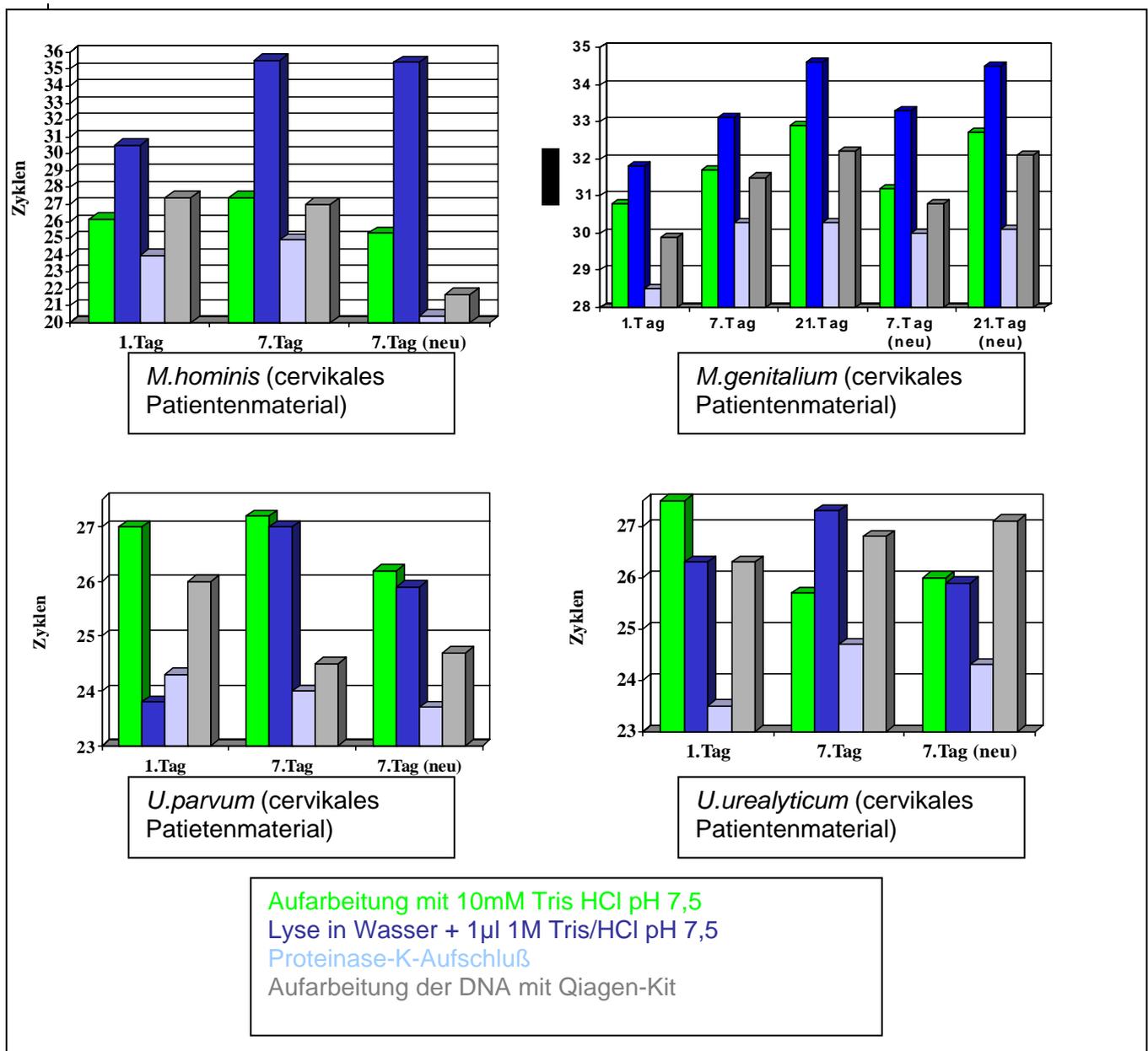


Abb. 3.10: Vergleich vier verschiedener Aufarbeitungsmethoden von zervikalem Patientenmaterial

Ein Nachweis von *M. genitalium* und *U. urealyticum* aus urethralem Abstrichmaterial erfolgte wiederum am effektivsten, wie Abbildung 3.11 veranschaulicht, nach Proteinase-K-Behandlung, wohingegen bei *M. hominis* und *U. parvum* durch Lyse der Bakterien in Wasser und Stabilisierung der Probe durch Zugabe von 1% (v/v) 1 M Tris/HCl, pH 7,5 die besten Resultate erzielt werden konnten.

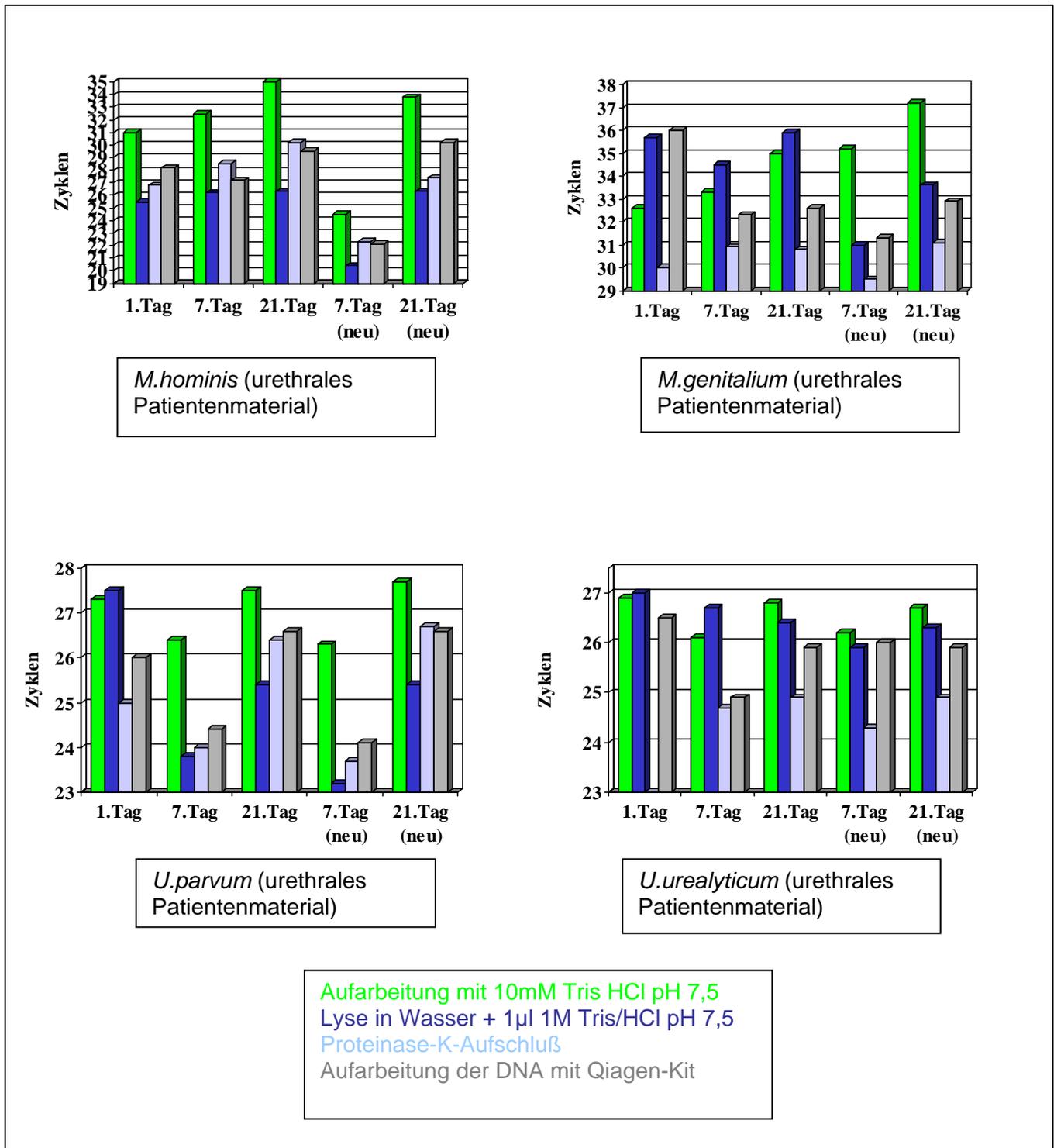


Abb. 3.11: Vergleich vier verschiedener Aufarbeitungsmethoden von urethralem Patientenmaterial

3.6 Evaluierung der PCR

Um die Speziespezifität und -sensitivität der *U. urealyticum* und *U. parvum* PCR sicherzustellen, wurden alle 14 Serovare jeweils in beiden Taqman PCR's auf Kreuzreaktivität getestet.

Aus Abbildung 3.12 wird ersichtlich, dass die jeweilige Ureaplasmen PCR all ihre Serovare detektierte und nur zu maximal 0,15% mit einem Serovar der anderen Ureaplasmenspezies kreuzreagierte.

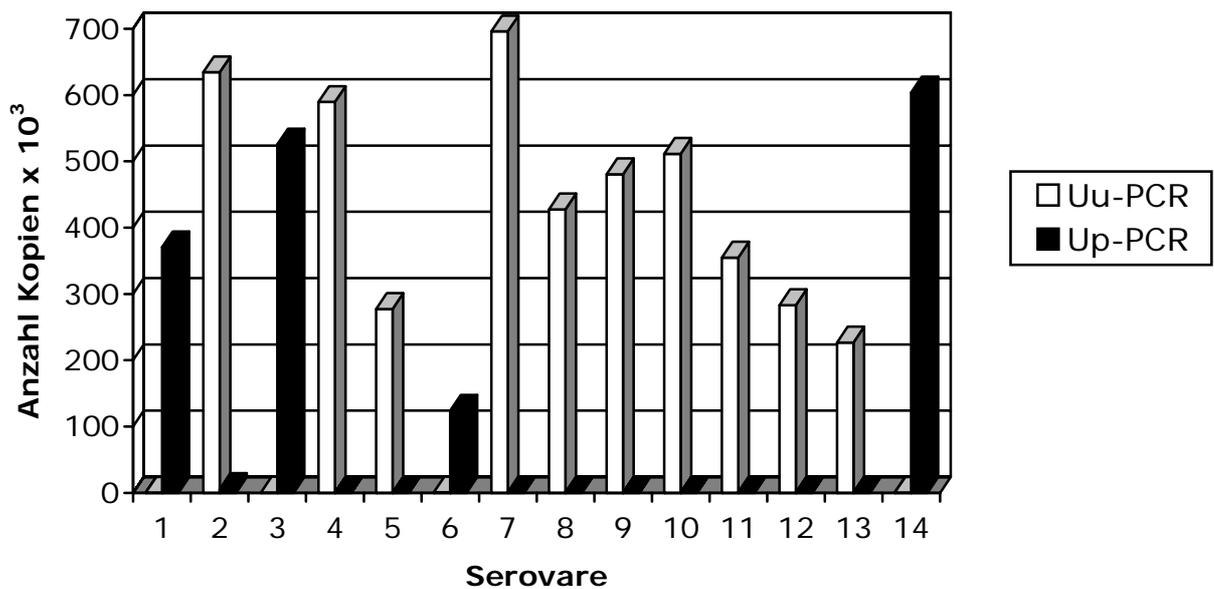


Abb. 3.12: Nachweis der Kreuzreaktion der Ureaplasmen-PCRs mit der jeweils anderen Ureaplasmenspezies durch Einsatz der 14 Serovare in beide PCRs

Um zu zeigen, dass die beiden *Ureaplasma* Taqman PCR's spezies-spezifisch sind, musste ausgeschlossen werden, dass andere Bakterien, die auch Harnstoff spalten können und somit ebenfalls ein Ureasegen besitzen, in den PCRs nachgewiesen werden. Povlsen und Mitarbeiter beschrieben 1998 folgende Urease-positive Bakterien: *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Haemophilus parainfluenza*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Streptococcus salivarius*, *Helicobacter pylori* und *Bordetella parapertussis* (44). Isolate der fünf zuerst genannten Erreger konnten aus dem Diagnostiklabor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf zur kulturellen Anzucht erhalten werden. Da man bei allen Isolaten von ungefähr der gleichen Bakterienmenge ausgehen wollte, wurde eine Keimzahlbestimmung durchgeführt, und um nachzuweisen, dass diese Stämme auch tatsächlich Harnstoff spalten, wurden sie einem biochemischen Ureasenachweis unterzogen

(s. Kapitel 2.1). Als Positivkontrolle wurde Serovar I für *U. parvum* und Serovar II als Vertreter von *U. urealyticum* verwendet. Wie in Abbildung 3.13 zu sehen, blieb der Ansatz mit *Klebsiella pneumoniae* ohne Farbumschlag, was zeigte, dass dieses Isolat keine aktive Urease exprimiert und somit für den Einsatz in die PCR ungeeignet war. *Haemophilus influenza* und *parainfluenza*, *Proteus mirabilis* und *Yersinia enterocolitica*, sowie beide Ureaplasmaspezies, zeigten mit dem Farbumschlag eine Harnstoffspaltung und somit die Aktivität und Präsenz der Urease an.



Abb. 3.13 Nachweis der Harnstoffspaltung bei kultureller Anzucht der Urease-positiven Bakterienspezies in Harnstoffmedium

Die vier Urease-positiven Isolate wurden anschließend in der RealTime PCR für den Nachweis von *Ureaplasma* getestet. Abbildung 3.14 zeigt, dass sich nur *U. urealyticum* und *U. parvum* amplifizieren ließen, was bewies, dass die Taqman PCRs für *U. parvum* und *U. urealyticum* speziesspezifisch sind.

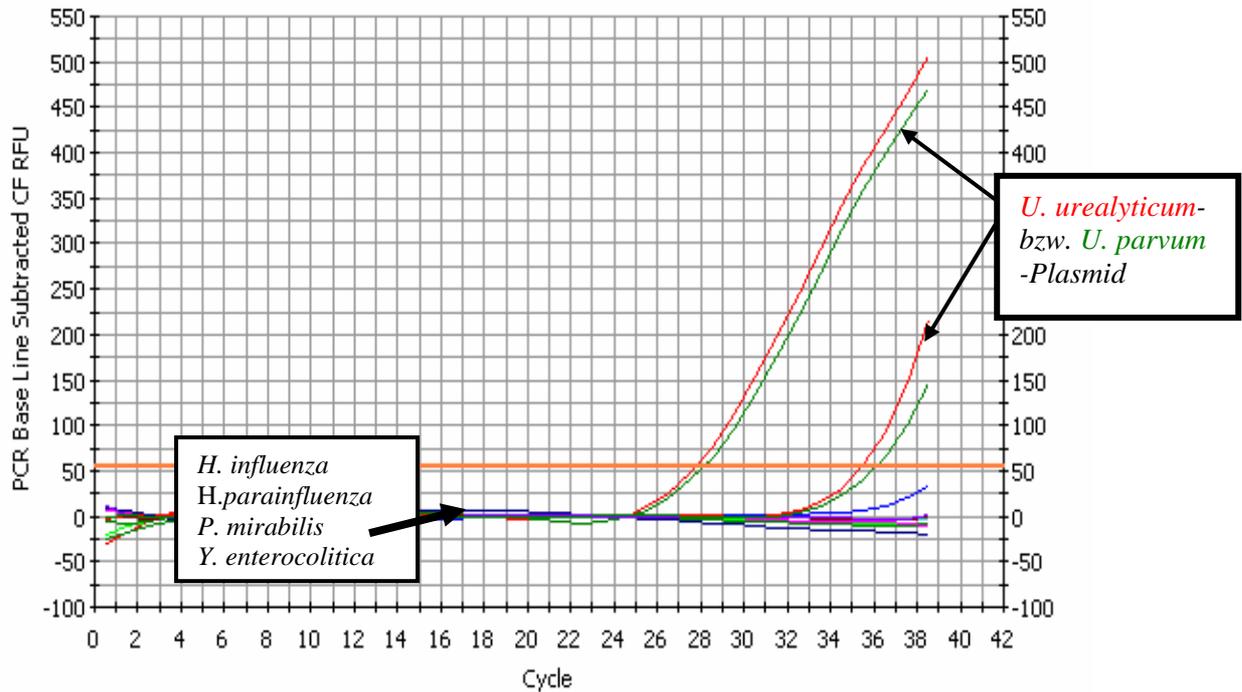


Abb. 3.14: Ureaplasmen-Taqman PCR an urease-positiven Bakterien

(rot: *U. urealyticum* – Plasmid mit $2,5 \times 10^5$ bzw. $2,5 \times 10^3$ Kopien

grün: *U. parvum* – Plasmid mit $2,5 \times 10^5$ bzw. $2,5 \times 10^3$ Kopien)

3.7 Neukonzeption der *M. hominis*-PCR

Um *Mycoplasma hominis* mittels RealTime PCR mit hoher Sensitivität nachweisen zu können, musste auch hier ein geeignetes Gen gefunden werden, an dem man eine Amplifikation durchführen konnte. Die Wahl fiel anfänglich auf das Lysyl-tRNA-Synthetasegen. Erste Tests, die ohne Sonde mit den randständigen Primern in der RealTime PCR an das *M. hominis* Isolat FBG durchgeführt wurden, waren erfolgreich, zeigten jedoch nach Sequenzierung des Amplikons in der Sondenbindungsstelle eine Punktmutation zwischen der Sequenz des Datenbankeintrags und der Sequenz des *M. hominis*-Isolates FBG. Aus diesem Grunde wurden beide Sonden synthetisiert, die sich nur in der detektierten Punktmutation unterschieden. Wie Abbildung 3.15 veranschaulicht, lieferte der Einsatz von Sonde II (die der Sequenz des *M. hominis* FBG entsprach) in der RealTime PCR an unterschiedliche Isolate von *M. hominis* bessere Ergebnisse als Sonde I (die von der Sequenz der Datenbank abgeleitet wurde), da bei gleicher Einsaat an DNA in fast allen Fällen die Amplifikationskurven bei Verwendung von Sonde II bei kleinerer Zyklenzahl positiv wurden.

Hieraus konnte der Schluss gezogen werden, dass die Sonde II homologer zu den getesteten *M. hominis*-Isolaten ist.

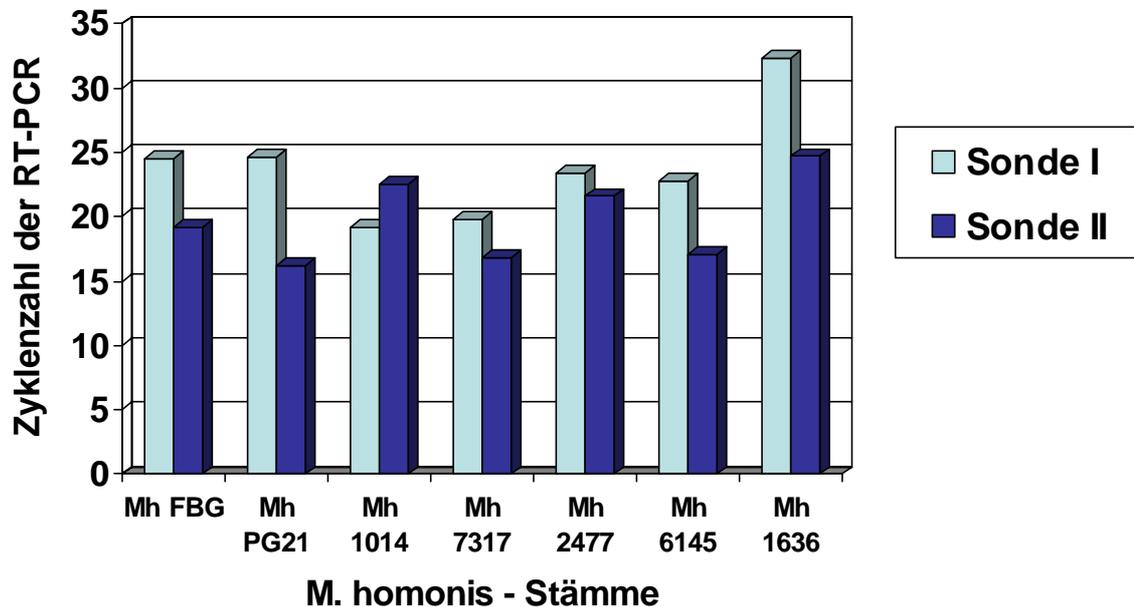


Abb. 3.15: Zwei *M. hominis*-Sonden im Vergleich

Nachdem bei mehreren RealTime PCRs kulturell frisch angezüchtete *M. hominis*-Stämme nicht amplifiziert wurden, wurde offensichtlich, dass diese *M. hominis*-PCR nicht sehr sensitiv war.

Da in der Mycoplasmenarbeitsgruppe des Instituts für Medizinische Mikrobiologie Gegenstand der Forschung u.a. P80, ein *M. hominis* spezifische Membranprotein war, stellte sich die Frage, ob nicht dieses komplett entschlüsselte Gen geeignete Sequenzabschnitte für den Nachweis dieser Spezies in der RealTime PCR aufweisen würde. Die Suche nach „TaqMan Probes & Primer Design“, dem Unterprogramm von Primer Express, das normalerweise zum Design einer TaqMan PCR benutzt wird, lieferte enttäuschenderweise keinen geeigneten Sequenzabschnitt. Bei Verwendung des Unterprogrammes „TaqMan MGB Probes & Primer Design“, bei dem aufgrund eines der Sonde angefügten „Minor Groove Binding“-Moleküls die Sonde und somit der zu amplifizierende Genbereich kürzer ist (60 nt statt 70-80nt), wurden Primer und Sonde ermittelt, die aufgrund des sehr geringen Penaltywertes des Amplikons von 55 eine hohe Sensitivität erwarten ließen. Auch der Datenbankabgleich des Amplikons mit anderen Bakteriensequenzen wies auf keine Kreuzreaktivitäten der Primer mit anderen humanbesiedelnden Spezies auf.

Um eine eventuelle Variabilität der Primer- und Sondenbindungsstellen zu bestimmen, wurden, wie in Abb. 3.16 schematisch dargestellt ist, verschiedene *M. hominis*-Isolate einer konventionellen PCR mit einem Primerpaar (Th 1 als Forwardprimer und Th 5 als Reverseprimer) unterzogen, in der ein größerer Bereich des P80 Gens amplifiziert wurde, der den Bereich der Primerbindungsstellen der TaqMan-PCR beinhaltet. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im 1,5 %-igem Agarosegel zeigt Abbildung 3.17.

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche aufgereinigt und sequenziert, um herauszufinden, wie homolog die einzelnen Stämme in der zu amplifizierenden P80-Region sind. Die Sequenzierung ergab eine hundertprozentige Homologie aller getesteten *M.hominis*-Isolate im oben genannten Bereich.

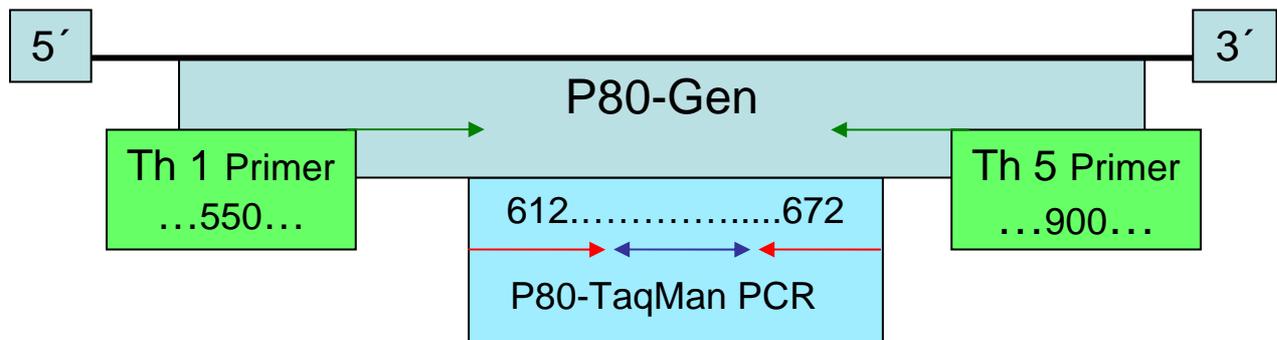


Abb. 3.16: Darstellung der Primerbindungsstellen im P80-Gen

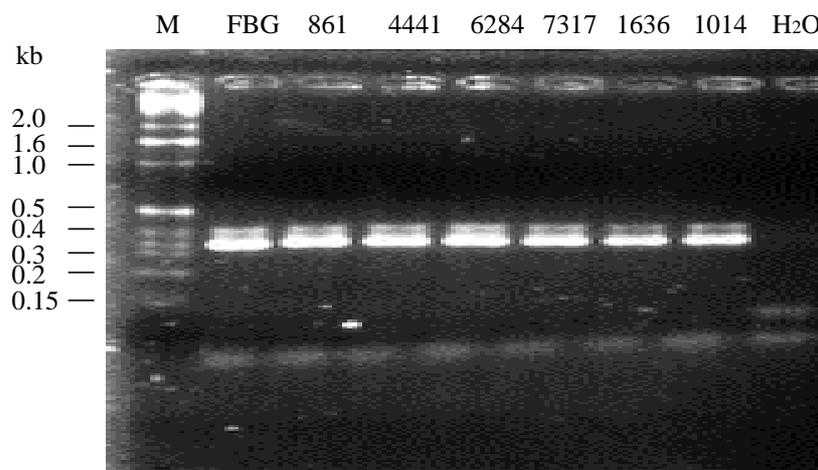


Abb. 3.17: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation einer den Bereich des Realtime-Amplikons umschließenden 350 bp Region des P80 Gens an verschiedene Isolate von *M. hominis*.

M: Molekulargewichtsmarker: 1kb DNA Leiter von Gibco BRL

In einem Vorversuch wurden nun zuerst die Primer in einer Realtime PCR mit SybrGreen an die DNA verschiedener *M. hominis* Isolate getestet. Die Ergebnisse waren gegenüber den zuvor genutzten Primern, die das Gen des Enzyms Lysyl-t-RNA-Synthetase als Ziel besaßen, sehr zufriedenstellend, da alle getesteten Isolate detektiert wurden, sodass nun auch die entsprechende Sonde synthetisiert werden sollte. Als Alternative zu einer MGB-Sonde wurden von der Firma Biospring einzelne Nukleotide so modifiziert, dass trotz Fehlens des MGB-Moleküls eine verstärkte Bindung der kurzen Sonde an die Zielsequenz stattfand (Kapitel 2.1.1 zeigt die Sequenzen der neu konzipierten Primer und Sonde).

Da *M. hominis* nicht die einzige, den Menschen besiedelnde Mycoplasmenspezies ist, musste ausgeschlossen werden, dass die Primer vom *M. hominis* nicht auch andere Mycoplasmen detektieren würden. Hierfür wurden aus der Diagnostikstammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene folgende Stämme angezüchtet: *M. genitalium* (Urogenital- und Respirationstrakt), *M. pneumoniae* (Oropharynx und unterer Respirationstrakt), *M. buccale* (Oropharynx), *M. fermentans* (Urogenitaltrakt), *M. orale* (Oropharynx), *M. primatum* (Oropharynx und Urogenitaltrakt), *M. salivarium* (Oropharynx und Urogenitaltrakt) und *M. arthritidis* (Urogenitaltrakt).

M. pulmonis ist zwar keine humanpathogene Spezies, zeigt jedoch zu *M. hominis* die höchste Sequenzhomologie und wurde deswegen in den Test miteinbezogen.

Nach der Probenaufarbeitung (siehe Kap. 2.2.7.1) wurden diese Spezies in der *M. hominis*-PCR getestet. Abbildung 3.18 zeigt, dass an die DNA diese Mycoplasmenspezies in der RealTime PCR keine Amplifikation stattgefunden hat.

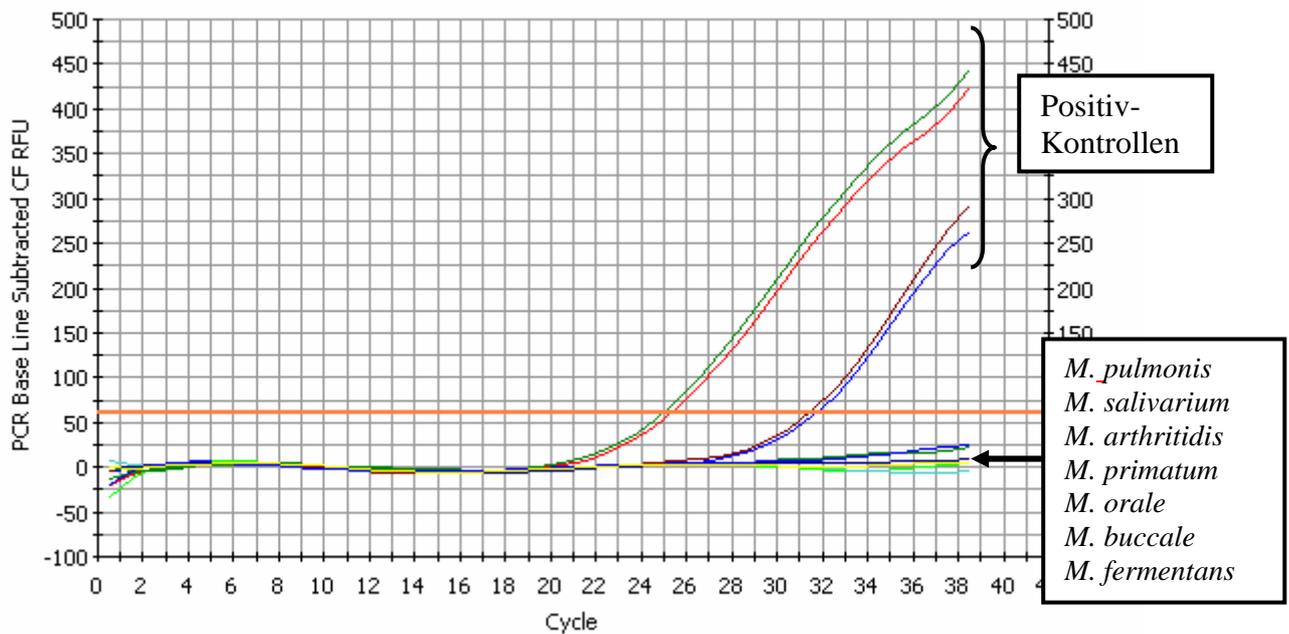


Abb. 3.18: Kreuzreaktivitätstest der *M. hominis*-Realtime PCR

Unter Einsatz ProteinaseK-behandelter Bakterienlysate verschiedener Mycoplasmenspezies wurde die Spezifität der *M. hominis*-Realtime PCR getestet. Als Positivkontrolle wurden 250.000 und 250 Kopien des klonierten *M. hominis*-Amplikons eingesetzt.

3.8 Validierung der PCR unter Einsatz von Patientenmaterial

Nachdem in den oben beschriebenen Versuchen ausschließlich mit Mycoplasmenreinkulturen aus der Stammsammlung des Instituts gearbeitet wurde, sollten nun die Patientenproben parallel zum kulturellen Nachweis in der Taqman PCR getestet werden.

Trifft ein zu analysierender Patientenabstrich im Institut für Medizinische Mikrobiologie in M4-Transportmedium ein, so wird das Röhrchen mitsamt des Tupfers und zweier innenliegender Glaskügelchen gevortext, damit sich möglichst viel Material vom Tupfer löst. Nach Entfernen des Tupfers entnimmt man 100µl der Suspension und gibt es in 2 ml des entsprechenden Nährmediums (Harnstoffmedium für *Ureaplasma spp.* und Argininmedium für *M. hominis*; die Beimpfung von Glukosemedium zur kulturellen Anzucht von *M. genitalium* wird in der Regel aufgrund des extrem langsamen Wachstums dieser Mycoplasmenspezies nicht durchgeführt).

Für den PCR-Ansatz wurde 1ml Suspension aus dem M4-Medium entnommen und zentrifugiert. Vor Einsatz der Probe in die PCR wurde das Bakteriensediment zuerst einmal mit PBS gewaschen und dann einer Proteinase-K-Behandlung unterzogen (siehe Kapitel 2.1).

Tabelle 3.1 und 3.2 zeigen die Ergebnisse der Ureaplasmen- und Mycoplasmendiagnostik im Vergleich von Kultur und RealTime PCR für das Jahr 2003. Hierbei stellte sich eine Übereinstimmung dieser beiden Nachweismethoden von 97,4 % bei den Ureaplasmen und 96,5 % bei den Mycoplasmen heraus. Unter der Maßgabe, dass der kulturelle Nachweis bis heute noch den Goldstandard darstellt, ergibt sich für die Ureaplasmen eine Sensitivität der RealTime PCR von 89% und eine Spezifität von 99%. Der positive prädiktive Wert (richtig positive Befunde an der Gesamtzahl aller positiven Befunde gemessen am kulturellen Nachweis) liegt damit bei ebenfalls 99%. Bei den Mycoplasmen beträgt die Sensitivität 62%, die Spezifität 98% und der positive prädiktive Wert 75%.

Mycoplasmen	PCR negativ	PCR positiv
Kultur negativ	446	6
Kultur positiv	11	18

Tab. 3.1: Vergleich des Mycoplasmennachweises mittels Kultur und RealTime PCR

Ureaplasmen	PCR negativ	PCR positiv
Kultur negativ	356	1
Kultur positiv	12	99

Tab. 3.2: Vergleich des Ureaplasmennachweises mittels Kultur und RealTime PCR

3.9 Korrelation zwischen nachgewiesener Mycoplasmenart und Krankheitssymptomen

Bei der statistischen Auswertung der Mycoplasmennachweise des Jahres 2003 wurde zusätzlich zur in Kapitel 3.8 beschriebenen Überprüfung der Sensitivitäten und Spezifitäten nach Zusammenhängen zwischen dem Nachweis einzelner Mycoplasmenart und bestimmter Krankheiten oder Symptome geforscht. Durch Einsatz der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Realtime-PCR war es erstmalig möglich, auftretende Krankheitssymptome in Relation zur identifizierten Mycoplasmenart zu setzen. Der kulturelle Nachweis (als

Goldstandard) konnte dies bislang nicht liefern; hier wurden lediglich Mollicutes mit bestimmter Stoffwechsellistung (Harnstoff- oder Argininspaltung,) identifiziert. Im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf werden die Befunde computergestützt verarbeitet, so dass die anonymisierten Patientendaten auf angegebene Symptome bzw. Diagnosen gescreent und nach den Ergebnissen der RealTime PCR getrennt nach den Spezies *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum* und *U. urealyticum* analysiert werden konnten. Betrachtet man die PCR-positiven Proben, so ergibt sich folgende Verteilung:

RealTime PCR				
Symptome	<i>M.hominis</i>	<i>M.genitalium</i>	<i>U.parvum</i>	<i>U.urealyticum</i>
unspezifische Genitalinfektion	2	2	15	2
Ausfluss/Juckreiz			5	
Dysurie		1		1
V.a. Gonorrhoe		1		2
Dauerblutung			1	2
Urethritis	1		1	
Adnexitis			2	
Kolpitis			3	
Fieber/Infekt	1		4	
Kinderwunsch	1			1
Partnerbehandlung	1		3	
Chron. UB-Schmerzen			4	
SS-Routine			3	1
Intrauter. Fruchttod			1	
Vorzeit. Blasensprung			1	
Frühgeborenes			1	
Vorzeit. Wehen			2	
Abort			1	
Sex. Missbrauch			1	

Tab. 3.3: Erkrankungen bzw. Symptome der Patienten mit PCR-positiven Abstrichmaterial

Positive Mycoplasmennachweise wurden neben Adnexitis, Urethritis, Kolpitis überwiegend bei unspezifischen Genitalinfektionen gefunden, und Symptomen wie Ausfluss und Juckreiz. Es fiel jedoch auf, dass bei Komplikationen in der Schwangerschaft wie beispielsweise Frühgeburtlichkeit oder vorzeitige Wehentätigkeit als einzige Mycoplasmenspezies *U. parvum* vorkam, wobei festzustellen war, dass von den in 2003 positiv befundeten *Mollicutes* 70 % von *U. parvum* stammten.

4. Diskussion

Anfang der 1970er Jahre kam Har Gobind Khorana auf den Gedanken, DNA durch zwei flankierende Primer zu vervielfältigen (54), jedoch geriet die Idee in Vergessenheit. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde dann in den frühen 80er Jahren von Kary Banks Mullis erneut erfunden (55). Nur sieben Jahre, nachdem er seine Idee veröffentlicht hatte, wurde Mullis hierfür der Nobelpreis für Chemie verliehen. Seine Idee war es, ein Verfahren zu entwickeln, das DNA durch sich zyklisch wiederholte Verdoppelung mit Hilfe der DNA-Polymerase künstlich vervielfältigt. Bereits in Mullis' ursprünglichem PCR-Versuch wurde das Enzym *in vitro* verwendet. Die doppelsträngige DNA wurde durch Erhitzen auf 96°C in zwei Einzelstränge aufgeteilt; durch Senken der Temperatur konnten die zugesetzten Primer binden und als Startpunkt für die Neusynthese des 2. Stranges dienen. Bei Wiederholung dieser drei Schritte wurde die DNA-Polymerase jedes Mal im 96°C-Schritt zerstört und musste daher erneut zugesetzt werden. Mullis' ursprüngliches Verfahren war sehr ineffizient, da es viel Zeit, große Mengen DNA-Polymerase und ständige Aufmerksamkeit erforderte. Später wurde der PCR-Prozess verbessert, indem man die DNA-Polymerase von thermophilen Bakterien verwendete, die bei über 110 °C in Geysiren leben. Die DNA-Polymerase dieser Lebewesen ist thermostabil und wird daher beim Erhitzen während der PCR-Zyklen nicht zerstört. Da nicht mehr ständig neue DNA-Polymerase hinzugefügt werden musste, konnte der Vervielfältigungs-Vorgang erheblich vereinfacht und automatisiert werden. Eine der ersten thermostabilen DNA-Polymerasen wurde aus *Thermophilus aquaticus* gewonnen und Taq-Polymerase genannt.

Die Untersuchung von biologischem Material mit molekularbiologischen Methoden hat durch die PCR in den letzten Jahren einen besonderen Aufschwung erfahren. Eine der wichtigsten Anwendungen der PCR liegt in der medizinischen Diagnostik. Mit Hilfe weniger Tropfen Blut, einer Gewebeprobe oder weniger Zellen einer Bakterienkolonie, lässt sich, unter der Voraussetzung, dass die Ursache einer Erkrankung molekulargenetisch ausreichend gut bekannt ist, nachweisen, ob eine bestimmte, krankheitsassoziierte DNA-Sequenz vorhanden ist. So stellt die PCR auch beim Nachweis von Krankheitskeimen eine Alternative zur kulturellen Anzucht dar.

Die konventionelle PCR brachte für die Laborarbeit zwar wesentliche Erleichterungen, zugleich war jedoch ein hoher Zeit- und Arbeitsaufwand für die Nachanalytik notwendig. Um das Automatisierungsniveau zu erhöhen, versuchte man deshalb ein homogenes Assay zu entwickeln, bei dem Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Dies gelang erstmals 1993 mit der von Lee und

Mitarbeitern (62) entwickelten Echtzeit-Fluoreszenz-PCR. Dieser so genannte TaqMan PCR Assay basiert auf der 5'-3'- Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Hierfür wird eine spezielle Sonde eingesetzt, deren 5'- Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencherfarbstoff trägt. Wenn die intakte Sonde an den Primer-flankierten Bereich des DNA-Strangs bindet, wird die Fluoreszenzemission des Reporters durch den Quencher „unterdrückt“. Wenn jetzt während der PCR die Taq-Polymerase auf die gebundene Sonde trifft, wird das Reportermolekül durch Aktivierung der 5'-Nuklease abgespalten und die Hemmung der Fluoreszenz durch räumliche Entfernung vom Quencher aufgehoben. Entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte steigt die Fluoreszenz des freigesetzten Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Diese Veränderung wird schließlich Zyklus für Zyklus von dem RealTime PCR Gerät im geschlossenen Reaktionsgefäß detektiert.

Wie aussagekräftig die RealTime PCR jedoch gegenüber den herkömmlichen Nachweismethoden ist, sollte in dieser Arbeit am Beispiel urogenital-relevanter Mollicutes untersucht werden, deren kultureller Nachweis zeitaufwändig, schwierig und nicht spezies-identifizierend ist.

Das Hauptmerkmal der *Mollicutes* besteht im Fehlen einer Zellwand. Sie sind die kleinsten bekannten Mikroorganismen, die sich autonom vermehren können. Mycoplasmen und Ureaplasmen, die der Klasse der *Mollicutes* angehören, sind meist fakultativ pathogene Krankheitskeime. *M. hominis* ruft bei Frauen Vaginitis, Adnexitis, z.T. Abszesse und Septikämien, bei Männern Prostatitis und Urethritis hervor (5). Ureaplasmen sind seit den 1950er Jahren als Auslöser einer Nicht-gonorrhöischen-Urethritis (NGU) beim Mann bekannt (46). Des Weiteren verursachen sie bei Frauen Frühgeburtlichkeit und unspezifische Genitalinfektionen (8).

M. genitalium gilt ebenfalls als Erreger der Urethritis (17,18). Zudem verursacht *M. genitalium* bei Frauen Endometritis, Salpingitis, Cervizitis und Entzündungen des kleinen Beckens (Pelvic Inflammatory Disease) (24, 25, 26).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Real Time PCR entwickelt, die die Möglichkeit bietet, vier fakultativ-humanpathogene *Mollicutes* (*M. hominis*, *M. genitalium*, *U. parvum*, *U. urealyticum*) sowohl zu detektieren als auch zu quantifizieren.

Die Schwierigkeiten bei der Entwicklung dieser Real Time PCR bestanden zunächst darin, geeignete Primer zu finden, die Spezies-spezifisch an die jeweilige DNA hybridisierten.

In der Literatur sind mehrfach RealTime PCR-Verfahren als Diagnostikmethode für Mycoplasmen und Ureaplasmen beschrieben.

Jensen und Mitarbeiter verwendeten die Taq Man-PCR zum quantitativen Nachweis von *M. genitalium* (18), indem sie das MgPa-Gen zur Amplifikation benutzten. Das Urease-B-Gen stellte bei der Arbeitsgruppe von Mallard eine Möglichkeit zur Detektion von Ureaplasmen dar (51). In einer Arbeit von Baczynska und Mitarbeitern wurde für den Nachweis von *M. hominis* als Template das Mh-GAPDH-Gen, ein housekeeping-Gen, verwendet (42).

In der vorliegenden Arbeit wurden als Zielgene für den Nachweis von Ureaplasmen das Urease-B-Gen, für *M. hominis* das P80-Gen und für *M. genitalium* das *tuf*-Gen benutzt. In multiplen Tests auf Kreuzreaktivität und Homologien mit anderen Spezies zeigten sie sich für die Real Time PCR als geeignet, da sie jeweils spezifisch für den entsprechenden Erreger waren. Der Nachweis des humanen GAPDH-Gens wurde als Positivkontrolle für die Güte von Abstrichmaterialien und die Abwesenheit von Inhibitoren eingesetzt. Mit Hilfe klonierter Amplifikate als Standards war die Quantifizierung der Erreger in den Patientenmaterialien möglich. So konnten in allen PCRs minimal 25 Kopien detektiert werden.

Im Anschluss an die Suche nach geeigneten Primern bestand das Problem der Aufarbeitung der Proben für die PCR. Es sollte gewährleistet werden, dass ausreichend DNA zur Amplifikation in der Probe vorhanden war, gleichzeitig sollte jedoch die Menge der inhibitorischen Substanzen möglichst gering gehalten werden, um störende Faktoren auszuschließen. Schon Baczynska und Mitarbeiter (42) haben im Rahmen ihrer Arbeit mit *M. hominis* festgestellt, dass das Mycoplasmenmedium SP-4 die PCR-Reaktion inhibiert. Es war daher äußerst wichtig, die Proben vorher mehrmaligen Waschschritten zu unterziehen. In mehreren Versuchsreihen konnte ich zeigen, dass eine Proteinase-K-Behandlung insgesamt die besten Ergebnisse liefert. Das Verfahren von Blanchard und Mitarbeitern (32), das Probenvolumen von 5µl auf 1µl zu reduzieren, um somit eine Inhibierung der PCR zu umgehen, zeigte sich in meiner Arbeit als nicht vorteilhaft. Im Gegenteil, wurde ein Probenvolumen eingesetzt, das kleiner als 1µl umfasste, schlichen sich mehr Ungenauigkeiten beim Pipettieren ein, was sich anschließend in hohen Standardabweichungen bei der Quantifizierung der Probe in der Real Time PCR widerspiegelte.

Ein weiterer Aspekt, der den Umgang mit Mycoplasmen und Ureaplasmen erschwerte, war die Konservierung der DNA. Bei einer über mehrere Wochen eingefrorenen DNA-Probe zeigte sich, dass diese sich nur noch sehr schlecht amplifizieren ließ im Gegensatz zu frisch

aufgearbeiteten Proben. Jensen beschrieb schon 2003 Schwierigkeiten, Testergebnisse zu reproduzieren, da sich die DNA in den Proben während der Zeit des Lagerns abzubauen schien (18). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich demonstrieren, dass ein Proteinase-K-Aufschluss im Vergleich zu anderen Aufarbeitungsmethoden auch hier die besten Ergebnisse lieferte. Zwar war nach dreiwöchigem Lagern der Probe bei -20°C ein Verlust an DNA erkennbar, jedoch ließen sich die Bakterien noch detektieren, während bei anderen Aufarbeitungsmethoden, wie z.B. einer DNA-Präparation mittels eines käuflichen Kits, nach dieser Zeit keine Amplifikation mehr möglich war. Blanchard und Mitarbeiter (32) verglichen zwar nicht explizit die unterschiedlichen DNA-Aufarbeitungsmethoden miteinander, sie beschrieben für Ureaplasmen, dass mit der Proteinase-K-Behandlung die beste Reproduzierbarkeit von Testergebnissen erreicht werden konnte.

Um die Real Time PCR zu verifizieren, war ein Vergleich mit der Referenzmethode des kulturellen Nachweises nötig. Die aus den unterschiedlichsten Kliniken in das Diagnostiklabor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene eingesandten Patientenproben wurden während des gesamten Jahres 2003 sowohl einem kulturellem Nachweis der Mycoplasmen und Ureaplasmen als auch einer parallel stattfindenden Real Time PCR unterzogen. Hierbei stellte sich eine Übereinstimmung dieser beiden Nachweismethoden von 97,4 % bei den Ureaplasmen und 96,5 % bei den Mycoplasmen heraus. Somit ergeben sich für die Ureaplasmen eine Sensitivität der RealTime PCR von 89% und eine Spezifität von 99%, im Hinblick darauf, dass der kulturelle Nachweis der Goldstandard darstellt. Der positive prädiktive Wert (richtig positive Befunde an der Gesamtzahl aller positiven Befunde gemessen am kulturellen Nachweis) liegt damit bei ebenfalls 99%. Bei den Mycoplasmen beträgt die Sensitivität 62%, die Spezifität 98% und der positive prädiktive Wert 75%.

Diese Zahlen sind vergleichbar mit denen aus anderen Studien, wobei in der Literatur nur Vergleiche zwischen kultureller Anzucht und konventioneller PCR zu finden sind. Blanchard et al (32) stellten eine PCR-gestützte Detektion von Ureaplasmen dem kulturellen Nachweis gegenüber. Hierbei kamen nur zwei DNA-Sequenzen zur Amplifikation in Frage. Publiziert war zum einen das 16S rRNA Gen, was sich jedoch als nicht geeignet erwies, da es der Gensequenz von *M. pneumoniae* zu ähnlich ist. Auf der anderen Seite besitzen die Urease-Struktur-Gene einzigartige Sequenzen, die nicht in anderen Mycoplasmen, aber in anderen Urease-produzierenden Bakterien vorkommen. Daher wurden Primersequenzen des

Ureasegens verwendet, die nicht homolog zu dem der ebenfalls Urease-produzierenden Bakterien wie *P. vulgaris*, *P. mirabilis* bzw. *Klebsiella pneumoniae* waren. Im Vergleich der PCR mit dem kulturellen Nachweis stimmten von 250 urogenitalen Abstrichen 182 im Ergebnis in beiden Methoden überein, wobei 53 Proben Kultur-positiv und PCR-negativ bzw. 15 Proben PCR-positiv und Kultur-negativ waren. Für diese hohe Divergenz ergaben sich zwei mögliche Erklärungen. Zum einen stellte man sich die Frage, ob die für die PCR ausgewählten Primer alle Isolate detektieren können. Diese Hypothese konnte ausgeräumt werden, indem alle in der PCR getestet wurden und das Urease-Gen bei allen amplifiziert wurde. Zum anderen vermuteten Blanchard und Mitarbeiter, dass im PCR-Ansatz Faktoren vorhanden sein müssten, die die Detektion inhibieren. Um die Konzentration dieser Inhibitoren zu reduzieren, wurde das Probenvolumen von initial 5µl auf 1µl reduziert. Diese Maßnahme lieferte daraufhin bessere Ergebnisse, sodass sich die PCR als geeignete Nachweismethode für Ureaplasmen erwies.

Abele-Horn und Mitarbeiter (33) verglichen die Effektivität des Nachweises von Ureaplasmen und *M. hominis* mit Hilfe einer konventionellen PCR mit dem kulturellen Nachweis dieser Spezies. Hier wurde ebenfalls für den Ureaplasmen-Nachweis das Urease-Gen bzw. für den *M. hominis*- Nachweis das 16S-RNA-Gen verwandt. Die Sensitivität der PCR bezogen auf die Kultur lag bei 95% für beide Organismen, während die Sensitivität der Kultur bezogen auf die PCR 91% betrug. Die Spezifität der PCR war 99% verglichen mit dem kulturellen Nachweis, der sich nur zu 97% als spezifisch herausstellte.

In dieser Untersuchung von Abele-Horn und Mitarbeitern waren sechs von 11 Proben Kultur-positiv, jedoch PCR-negativ im Ureaplasmenachweis, sowie zwei von sechs *M. hominis* – Nachweise in der Kultur positiv, jedoch PCR negativ. Hierbei wurde die Vermutung geäußert, dass eventuell zuviel Erregermaterial, welches in diesen Proben nachgewiesen wurde ($> 10^5$ Mikroorganismen) die Amplifikation der DNA inhibiert haben könnte. Trotz dieses „Fehlers“ erwies sich die PCR in der Arbeit als sensitiver gegenüber dem kulturellen Nachweis. In ihr wurden ebenfalls die Vorteile des schnelleren Nachweises gesehen, die Zeit bis zum endgültigen Ergebnis konnte von zwei bis fünf Tagen auf 24 Stunden reduziert werden.

Die Arbeitsgruppe von Stellrecht (19) hat eine Multiplex PCR entwickelt, um simultan Ureaplasmen, *M. genitalium* und *M. hominis* in Patientenabstrichen nachzuweisen. Basierend auf einer Prävalenz von 36%, sich an einem dieser Erreger zu infizieren, war die Sensitivität, Spezifität, positiver bzw. negativer Vorhersagewert dieser Multiplex PCR verglichen mit dem kulturellen Nachweis 87, 96, 94 bzw. 93%. Somit bot auch hier die PCR eine sensitive und schnelle Methode des Nachweises von urogenitalen Mycoplasmen und Ureaplasmen.

Im Rahmen der statistischen Auswertung der Mycoplasmennachweise unseres Institutes aus dem Jahr 2003 wurden nicht nur die Sensitivitäten bzw. Spezifitäten der Real Time PCR im Vergleich mit dem kulturellen Nachweis untersucht, sondern es interessierte ebenfalls, ob es zwischen den einzelnen Mycoplasmenspezies und dem Auftreten bestimmter Krankheiten oder Symptome ein Zusammenhang bestand. In diese Statistik wurden alle Mycoplasmen-positiv getesteten Patienten aufgenommen, es wurde nicht zwischen den einzelnen Kliniken (bzw. zwischen Männern und Frauen) differenziert. Es fiel auf, dass von den Patienten, bei denen 2003 eine Mycoplasmeninfektion mittels Kultur und Real Time PCR nachgewiesen wurde, 70% *U. parvum*-positiv waren. Die verbleibenden 30% verteilten sich zu gleichen Teilen auf *M. hominis*-, *M. genitalium*- bzw. *U. urealyticum*. Die meisten Patienten wurden mit einer unspezifischen Genitalinfektion vorstellig, wobei auch hier *U. parvum* mit 75% am häufigsten vertreten war. Auch bei Schwangerschaftskomplikationen wie z.B. vorzeitige Wehentätigkeit, vorzeitiger Blasensprung oder auch Abort ließ sich unter den untersuchten zellwandlosen Bakterien nahezu ausschließlich *U. parvum* diagnostizieren. Bei den anderen Erregern ergab sich keine Signifikanz in Hinblick auf spezielle Erkrankungen.

Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden aus einer Arbeit von Abele-Horn und Mitarbeitern überein (56), die den Zusammenhang zwischen den beiden Ureaplasmen-Biovarn und speziellen Erkrankungen bei gynäkologischen Patientinnen, Neugeborenen und Wöchnerinnen untersuchte. Hierbei wurde herausgefunden, dass Frauen öfter mit *U. parvum* (81%) als mit *U. urealyticum* (30%) infiziert sind. In dieser Studie gingen jedoch beide Biovare mit Infektionen in der Schwangerschaft einher, es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen speziellen Erkrankungen und einem der Ureaplasmen-Biovare hergestellt werden.

Die Vorteile der RealTime PCR gegenüber der konventionellen PCR sind, wie oben bereits erwähnt, neben der erheblichen Zeitersparnis und dem Wegfall der Nachanalytik, die Reduktion der Probenkontamination während der Vorbereitung durch lediglich einen Pipettierschritt, der speziesspezifische Nachweis eines Erregers, eine Quantifizierung der nachgewiesenen Genomäquivalente und somit die Berechnung der Keimzahl in einer Patientenprobe.

Die Weiterentwicklung der RealTime PCR besteht in der Multiplex - RealTime PCR, in der simultan mehrere Erreger in einem Ansatz nachgewiesen werden können.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf die RealTime PCR, wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene in Düsseldorf die Multiplex- RealTime PCR standardmäßig für die Diagnostik urogenital relevanter *Mollicutes* eingeführt. Hierbei werden zwei Erreger in einer PCR-Reaktion detektiert. Kombiniert wird jeweils der *U. urealyticum* - mit dem *U. parvum* - bzw. der *M. hominis* - mit dem *M. genitalium* - Nachweis. Dies bietet wiederum den Vorteil der Zeitersparnis in der Vorbereitungsphase und eine Senkung der Materialkosten, da in einer 96-Well-Platte doppelt so viele Proben analysiert werden können, als bei Einzelnachweisen. Blaylock und Mitarbeiter (43) entwickelten eine Multiplex RealTime PCR für den *M. genitalium* – Nachweis. In einem Ansatz wurde simultan das *gyrA*-Gen von *M. genitalium* sowie das menschliche RNase P- Gen detektiert, wobei sich im Vergleich zwischen Multiplex-PCR und Einzelnachweis kein Unterschied in der Sensitivität ergab.

Abschließend lässt sich sagen, dass es sich durchaus lohnt, eine Real Time PCR als Alternative zur kulturellen Anzucht im Nachweis von urogenitalen Krankheitskeimen einzusetzen.

Da bei der Real Time PCR zur Detektion von PCR Produkten keine Nachanalyse mit Hilfe der Gelelektrophorese benötigt wird, ist es möglich, die Ergebnisse innerhalb eines Tages zu erhalten. Traditionsgemäß werden Ureaplasmen und Mycoplasmen mittels kultureller Anzucht nachgewiesen. Diese oft als „Goldstandard“ beschriebene Methode ist jedoch sehr arbeits- und zeitaufwendig. Zudem bleibt die Sensitivität des kulturellen Nachweises weiterhin unklar. So können sich beispielsweise in Ureaplasmen Kulturen fälschlicherweise andere mikrobiologische Spezies wie *Proteus ssp.* oder Hefen ansiedeln, die das Ergebnis beeinflussen (51). Wie auch schon oben beschrieben, zeigten Studien, die kulturelle und PCR-gestützte Nachweise der Ureaplasmen und Mycoplasmen aus Patientenmaterial vergleichen, dass die PCR der Kultur in Hinblick auf die Sensitivität meist überlegen ist (19, 52, 53). Ein limitierender Faktor für den Einsatz einer Real Time PCR könnte jedoch der höhere finanzielle Aufwand gegenüber dem kulturellen Nachweis sein. Für viele Kliniken oder Laboratorien stellt sich daher die Frage, ob sich die Etablierung einer solchen Diagnostikmethode langfristig kostendeckend umsetzen lässt. Betrachtet man allerdings den großen zeitlichen Vorsprung, den man mit der Real Time PCR in der Diagnostik gewinnt, können an anderer Stelle Kosten gespart werden.

5. Zusammenfassung

Urogenitale Krankheitserreger wie *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* und *U. parvum* wurden bisher mit Hilfe der kulturellen Anzucht nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Real Time PCR entwickelt, um ihren Nachweis zu verbessern. Vorteile gegenüber herkömmlichen Kultivierungsverfahren bietet die Real Time PCR, da sie den speziesspezifischen Nachweis und eine Quantifizierung der nachgewiesenen Genomäquivalente und somit die Berechnung der Keimzahl in einer Patientenprobe ermöglicht, was speziell bei fakultativ-pathogenen Keimen wie Ureaplasmen und *M. hominis* entscheidend für die ätiologische Bedeutung und auch für mögliche therapeutische Konzepte sein kann.

Mithilfe des Computerprogramms „Primer Express“ wurden geeignete Primer und Sonden für die Ureaplasmenspezies *U. urealyticum* und *U. parvum* (Ureasegen) sowie für *M. genitalium* (*tuf*-Gen) und *M. hominis* (P80-kodierendes *hitA*-Gen) ermittelt. Theoretisch (durch Datenbankabgleich) wie praktisch (durch Tests auf Kreuzreaktivität) erwiesen sich die ausgewählten Primer als speziesspezifisch. Um die in der TaqMan PCR amplifizierte Bakterien-DNA quantifizieren zu können, wurde durch Klonierung des Amplikons in ein Plasmid für jeden der vier Erreger eine standardisierte Probe erzeugt, deren DNA-Menge bekannt war und unter deren Einsatz computergestützt die DNA-Menge in jeder unbekannt Probe errechnet werden konnte. Als Positivkontrolle wurde das humane GAPDH-Gen verwendet, da mit jedem Abstrich auch humane Zellen entnommen werden.

Anfängliche Probleme, die sich aus der geringen Stabilität bzw. Haltbarkeit der Bakterien-DNA ergaben, konnten mit verbesserten Aufarbeitungsmethoden größtenteils behoben werden. So stellte sich der Proteinase-K-Aufschluß in mehreren Versuchsreihen als die beste Aufbereitungsmethode für Mycoplasmen und Ureaplasmen heraus.

Für das Jahr 2003 wurden die Ergebnisse der Ureaplasmen- und Mycoplasmendiagnostik mittels kulturellen Nachweises mit der parallel durchgeführten Real Time PCR verglichen. Hierbei stellte sich eine Übereinstimmung von 97,4% bei den Ureaplasmen und 96,5% bei den Mycoplasmen heraus. Betrachtet man die kulturelle Anzucht als Goldstandard, so ergibt sich für die Ureaplasmen eine Sensitivität der Real Time PCR von 89% und eine Spezifität von 99%. Bei den Mycoplasmen beträgt die Sensitivität 62% und die Spezifität 98%. Im Vergleich der einzelnen Spezies mit den hervorgerufenen Erkrankungen, konnte festgestellt werden, dass von allen positiv befundeten *Mollicutes* 70 % von *U. parvum* stammten.

Weiterhin fiel auf, dass bei Komplikationen in der Schwangerschaft wie beispielsweise Frühgeburtlichkeit oder vorzeitige Wehentätigkeit als einzige Mycoplasmenspezies *U. parvum* vorkam.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und seitdem im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene in Düsseldorf etablierte Real Time PCR bietet als sensitive Methode durch ihre Spezifität entscheidende Vorteile gegenüber der herkömmlichen kulturellen Diagnostik.

In Weiterentwicklung der RealTime PCR – Technologie wird die Multiplex- RealTime PCR heute standardmäßig für die Diagnostik urogenital relevanter *Mollicutes* durchgeführt. Hierbei werden zwei Erreger in einer PCR-Reaktion detektiert, wobei jeweils der *U. urealyticum* - mit dem *U. parvum* - und der *M. hominis* - mit dem *M. genitalium* – Nachweis kombiniert wird. Im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität ist die Multiplex –PCR mit den Einzelnachweisen vergleichbar, zeichnet sich jedoch durch eine signifikante Material- und somit Kostenersparnis aus.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Razin S, Yogev D, Naot Y:
Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.
Microbiol Mol Biol Rev 1998, **62**:1094-1156
- 2 Meyer RD, Clough W:
Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adults: emphasis on immunosuppression.
Clin Infect Dis 1993, **17**: 243-249
- 3 Bolske G:
Survey of mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods.
Zentbl Bakteriol Mikrobiol Hy Ser 1988, **A269**:331-340
- 4 Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E, Li BC, Herrmann R:
Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*
Nucleic Acids Res 1996, **24**:4420-4449
- 5 Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G:
Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie
Urban und Fischer Verlag 1994 7.Auflage
- 6 Herold G (Hg):
Innere Medizin
2003
- 7 Schmidt-Matthiesen H (Hg), Hepp H:
Gynäkologie und Geburtshilfe
Schattauer Verlag 1997 8.Auflage

- 8 Hauri D, Jaeger P:
Checkliste Urologie
Thieme Verlag 2000 4.Auflage
- 9 Karow T (Hg), Lang-Roth R:
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie
2004
- 10 Baseman J.B, Lange M, Tully JG:
Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety
Emerging Infect Dis 1997, **3**:21-32
- 11 Ligon JV, Kenny GE:
Virulence of ureaplasma urease for mice
Infect Immun 1991, **59**:1170-1171
- 12 Kim JJ, Quinn PA, Fortier MA:
***Ureaplasma diversum* infection in vitro alters prostaglandin E₂ and Prostaglandin F₂ production by bovine endometrial cells without affecting cell viability**
Infect Immun 1994, **62**:1528-1533
- 13 Razin S, Tully JG (Hg):
Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmaology
Academic Press San Diego Calif 1995, **Vol.I**: Molecular characterization
- 14 Razin S, Tully JG (Hg):
Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmaology
Academic Press San Diego Calif 1996, **Vol.I**: Diagnostic procedures
- 15 Kröger M:
Anwendungen der PCR und deren methodische Grundlagen
BIOforum 1993, **16**:352-357

- 16 Schwenkel S:
Nachweis Urethritis-relevanter Krankheitskeime durch simultane Detektion Spezies-spezifischer Gequenzen im „housekeeping“ Gen *tuf*
Diplomarbeit im Fach Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der HHU Düsseldorf 2001
- 17 Jensen J, Ørsum R, Dohn B, Uldum S, Worm AM, Lind K:
***Mycoplasma genitalium*: a cause of male urethritis?**
Genitourin Med 1993, **69**:265-269
- 18 Jensen J, Björnelius E, Dohn B, Lidbrink P:
Use of TaqMan 5' Nuclease Real Time PCR for Quantitative Detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in Males with and without Urethritis who were Attendees at a Sexually Transmitted Disease Clinic
Journal of Clin Microbiology 2003, **42**:683-692
- 19 Stellrecht K, Woron A, Mishrik N, Venezia R:
Comparison of Multiplex PCR Assay with Culture for Detection of Genital Mycoplasmas
Journal of Clin Microbiology 2003, **42**:1528-1533
- 20 Robertson J, Stemke G, Davis J, Harasawa R, Thirkell D, Kong F, Shepard M, Ford D:
Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. Nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum*
Int Journal of Syst and Evolut Microbiology 2002, **52**:587-597
- 21 Taylor-Robinson D:
Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update
Clin Infect Dis 1996, **23**:671-684
- 22 Cassell G.H, Waites KG, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R:
***Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns.**
Clin Microbiol Rev 1993, **6**:69-87

- 23 Stray-Pederson B, Eng J, Reikvam TM:
Uterine T-mycoplasma colonization in reproductive failure
Am J Obstet Gynecol 1978, **130**:307-311
- 24 Hay PE, Taylor-Robinson D:
Defining bacterial vaginosis: to BV or not to BV, that is the question
Int J STD AIDS 1996, **7**: 233-235
- 25 Lind K, Kristensen GB:
Significance of antibodies to *Mycoplasma genitalium* in salpingitis
Eur J Clin Microbiol 1987, **6**:205-207
- 26 Manhart LE, Crichtlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE,
Totten PA:
Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*
J Infect Dis **187**:650-657
- 27 Deodhar LP, Pandit DV:
***Mycoplasma hominis* in women with bacterial vaginosis**
Indian J Med Res 1992, **95**:144
- 28 Tully JG, Smith LG:
Postpartum septicaemia with *Mycoplasma hominis*
JAMA 1968, **204**:827-828
- 29 Meis JF, van Kupperveld FJ, Kremer JA, Nijhuis JG, Melchers WJ:
Fatal intrauterine infection associated with *Mycoplasma hominis*
Clin Inf Dis 1992, **15**:753
- 30 Geisel R, Geisel S, Schmitz FJ, Henrich B:
Moderne Diagnostik urologischer Infektionen
Der Urologe 2003, **42**:634-640

- 31 Colaizy TT, Kuforiji T, Sklar RS, Pillers DA:
PCR methods in clinical investigations of human ureaplasmas: a minireview
Mol Gen and Met 2003, **80**:389-397
- 32 Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K, Cassell GH:
Detection of *Ureaplasma urealyticum* by Polymerase Chain Reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns
Clin Infect Dis 1993, **17(Suppl. 1)**:148-153
- 33 Abele-Horn M, Wolff C, Dressel P, Zimmermann A, Vahlensieck W, Pfaff F, Ruckdeschel G:
Polymerase Chain Reaction versus culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996, **15**:595-598
- 34 Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, Yasuda M, Tamaki M, Ishiko H, Maeda SI:
Association of *Ureaplasma urealyticum* (Biovar 2) with nongonococcal urethritis
Sex Trans Dis 2004, **31**:192-195
- 35 Jurstrand M, Jensen JS, Fredlund H, Falk L, Mölling P:
Detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimes by real-time PCR and by conventional PCR assay
J of Med Microbiol 2005, **54**:23-29
- 36 Maeda SI, Deguchi T, Ischiko H, Matsumoto T, Naito S, Kumon H, Tsukamoto T, Onodera S, Kamidono S:
Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* (Biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (Biovar 2) in patients with non-gonococcal urethritis using polymerase chain reaction-microtiter plate hybridization
Int J Urol 2004, **11**:750-754

- 37 Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, Tuttle SL, Paraskevas LR, Chasen S, Kalish R, Witkin SS:
***Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in midtrimester amniotic fluid: Association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome**
Am J Obst Gynecol 2004, **191**:1382-1386
- 38 Horner P, Thomas B, Gilroy CB, Egger M, Taylor-Robinson D:
Role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in acute and chronic Nongonococcal Urethritis
Clin Infect Dis 2001, **32**:995-1003
- 39 Yoshida T, Deguchi T, Masayasu I, Maeda SI, Masayoshi T, Ishiko H:
Quantitative Detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by Real-Time PCR
J Clin Microbiol 2002, **40**:1451-1455
- 40 Deguchi T, Yoshida T, Yokoi S, Masayasu I, Masayoshi T, Ishiko H, Maeda SI:
Longitudinal quantitative Detection by Real Time PCR of *Mycoplasma genitalium* in First-Pass Urine of Men with recurrent Nongonococcal Urethritis
J Clin Microbiol 2002, **40**:3854-3856
- 41 Yoshida T, Maeda SI, Deguchi T, Ishiko H:
Phylogeny-Based rapid identification of Mycoplasmas and Ureaplasmas from Urethritis Patients
J Clin Microbiol 2002, **40**:105-110
- 42 Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S, Christiansen G:
Development of Real Time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*
BMC Microbiol 2004, **4**:35
- 43 Blaylock MW, Musatovova O, Baseman JG, Baseman JB:
Determination of Infectious Load of *Mycoplasma genitalium* in Clinical Samples of Human Vaginal Cells
J Clin Microbiol 2004, **42**:746-752

- 44 Povlsen K, Jensen JS, Lind I:
Detection of *Ureaplasma urealyticum* by PCR and Biovar Determination by Liquid Hybridization
J Clin Microbiol 1998, **36**:3211-3216
- 45 Taylor-Robinson D, Furr PM:
Update on sexually transmitted mycoplasmas
Lancet 1998, **351(Suppl.3)**:12-15
- 46 Keane FE, Thomas BJ, Whitaker L, Renton A, Taylor-Robinson D:
An association between non-gonococcal urethritis and bacterial vaginosis and the implications for patients and their sexual partners.
Genitourin Med 1997, **73**:373-377
- 47 Hooton TM, Roberts MC, Roberts PL, Holmes KK, Stamm WE, Kenny GE:
Prevalence of *Mycoplasma genitalium* determined by DNA probe in men with urethritis.
Lancet 1988, **1**:266-268
- 48 Shepard MC, Luceford CD:
Serological typing of *Ureaplasma urealyticum* isolates from urethritis patients by an agar growth inhibition method.
J Clin Microbiol 1978, **8**:566-574
- 49 Abele-Horn M, Scholz M, Wolff C, Kolben M:
Highdensity vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization as a risk factor for chorioamnionitis and preterm delivery.
Acta Obstet Gynecol Scand 2000, **79**:973-978.
- 50 Heggie AD, Bar-Shain D, Boxerbaum B, Farnaroff A, O'Riordan MA, Robertson JA:
Identification and quantification of ureaplasmas colonizing the respiratory tract and assessment of their role in the development of chronic lung disease in preterm infants.

- Pediatr Infect Dis J* 2001, **20**:854–859.
- 51 Mallard K, Schopfer K, Bodmer T:
Development of real-time PCR for the differential detection and quantification of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*
J Microbiol Meth 2005, **60**:13-19
- 52 Luki N, Lebel M, Boucher B, Doray J, Turgeon R, Brousseau R:
Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998, **17**:255– 263.
- 53 Nelson S, Matlow A, Johnson G, Th'ng C, Dunn M, Quinn P:
Detection of *Ureaplasma urealyticum* in endotracheal tube aspirates from neonates by PCR.
J Clin Microbiol 1998, **36**:1236–1239.
- 54 Kleppe K; Ohtsuka E; Kleppe R; Molineux I; Khorana HG:
Studies on polynucleotides XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases.
J Mol Biol 1971, **56**:341-361
- 55 Mullis KB, Faloona FA:
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction.
Meth Enzymol 1987, **155**:335-350
- 56 Abele-Horn M, Wolff C, Dressel P, Pfaff F, Zimmermann A:
Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease.
J Clin Microbiol 1997, **35**:1199-1202
- 57 Cracea E, Constantinescu S, Lazar M:

- Serotypes of *Ureaplasma urealyticum* isolated from patients with nongonococcal urethritis and gonorrhea and from asymptomatic urethral carriers.**
Sex Transm Dis 1985, **12**:219-223
- 58 Maniloff J, McElhane RN, Finch LR, Baseman JB:
Mycoplasmas – Molecular Biology and Pathogenesis
American Society for Microbiology, Washington
1992
- 59 Burkhardt F (Hg):
Mikrobiologische Diagnostik
Georg Thieme Verlag 1992, S.309-314
- 60 Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell GH:
Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S-rRna Gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction.
J Clin Microbiol 1993, **31**:1358-1361
- 61 Skov-Jensen J, Uldum S, Sondergard-Andersen J, Vuust J, Lind K:
Polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples.
J Clin Microbiol 1991, **29**:46-50
- 62 Lee MS, Connell CR, Bloch W:
Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.
Nucleic Acids Res 1993, **21**:3761-3766

7. Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
kb	Kilobasen
M	Marker
<i>M.</i>	<i>Mycobakterium oder Mycoplasma</i>
mol	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PPLO	Pleurapneumonia like organism
RNA	Ribonukleinsäure
U.	<i>Ureaplasma</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

8. Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau PD Dr. Birgit Henrich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, die exzellente Betreuung meiner Arbeit, die unermüdliche Unterstützung, das Korrekturlesen und die wertvollen Ratschläge und Tipps.

Großer Dank gebührt Herrn Professor Dr. U. Hadding bzw. in der Nachfolge Herrn Professor Dr. K. Pfeffer für die zur Verfügungstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Mikrobiologie Düsseldorf.

Marzena Czarna und Miriam Hopfe aus der Mycoplasmenarbeitsgruppe des Instituts für Medizinische Mikrobiologie gilt mein besonderer Dank. Sie haben mich bei meiner praktischen Arbeit im Labor sehr unterstützt, ihr Wissen und ihre Ideen waren mir immer eine große Hilfe.

Ich danke ebenfalls allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie Düsseldorf für die Hilfe und für das überaus angenehme Arbeitsklima.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, für Geduld, Verständnis und die grenzenlose Unterstützung in meiner gesamten medizinischen Ausbildung.

9. Lebenslauf

Name:	Wibke Brenneisen	
Geburtsdatum:	07.03.1978	
Geburtsort:	Furtwangen	
Familienstand:	ledig	
Nationalität:	deutsch	
Schulbildung:	August 1985 – Oktober 1988 Oktober 1988 – Juli 1989 August 1989 – Juni 1998	Grundschule Schonach Grundschule Sulzburg Gymnasium Staufien Abschluss Abitur (Note1,8)
Ausbildung:	Juni 1998 –Juli 1999	Ausbildung zur Rettungssanitäterin im Rahmen eines Freiwilligen Sozialen Jahres, Deutsches Rotes Kreuz, Köln
Hochschulausbildung:	Oktober 1999 – Oktober 2005	Studium der Human- medizin an der HHU Düsseldorf Abschluss mit der Gesamtnote „gut“
Beruf:	November 2005 Seit Januar 2006	Approbation als Ärztin Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik des Allgemeinen Krankenhauses Hagen